

EXPERIENTIA



REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:

P. HUBER · R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA
Basel Lausanne Bern Zürich

Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL

SUISSE — SCHWEIZ — SVIZZERA — SWITZERLAND

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

G. KÖTHE: Das Bild der heutigen Mathematik 249

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

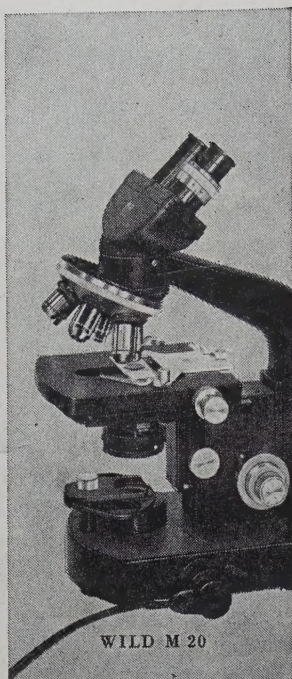
- E. BAYER und K. H. HAUSER: Eisen(III)-Komplexe mit ungepaarten Elektronen 254
K. WIESNER und J. A. EDWARDS: The Basicity and Steric Configuration of the Diterpene Alkaloids Veatchine and Atisine (Disputandum) 255
E. C. GROB und R. BÜTLER: Über einen möglichen Weg der Biosynthese der Carotinoide bei *Mucor hiemalis* 259
J. ZURZYCKI: A Micromethod for Measuring Photosynthesis 261
J. ZURZYCKI: The Dependence of Photosynthesis on the Arrangement of Chloroplasts 263
MARIA BASSI and A. BERNELLI-ZAZZERA: Water Content in Vacuolated Liver 264
R. WAEFFLER, R. GASSER, A. MARGOT und H. GYSIN: Über organische Fungizide 265
P. J. FODOR, C. FUNK, and PH. TOMASHEVSKY: Enzyme Levels in the Growing and Regressing Flexner-Jobling Carcinoma 266
L. S. BARON: Enzyme Activities of Vi Strains of *Salmonella typhosa* and their W Variants 268
T. KUWATA and S. SHIBA: Influence of Glucose on the Multiplication of Ornithosis Virus *in vitro* 269
T. W. GOODWIN and D. L. FOX: Some Observations on Pigments of the Pacific Sand Dollars, *Dendraster excentricus* and *Dendraster laevis* 270
B. SCHÄR und R. MEIER: Chemotaxine und Kapillarpermeabilität 272
P. A. SHORE, S. L. SILVER, and B. B. BRODIE: Interaction of Serotonin and Lysergic Acid Diethylamine (LSD) in the Central Nervous System 272
R. HIRT und R. BERCHTOLD: Zum Wirkungsmechanismus des Histamins 273
A. SEKERA, J. SOVA, and C. VRBA: Stability and Local Anaesthetic Effect in Some Derivatives of "Xylocaine" 275
G. ATTARDI: Spontaneous Peristaltic Activity in Arteries and Veins of Adult Goldfinches and Albino Mice Cultivated *in vitro* 276
V. REJHOLEC and V. WAGNER: Antimyocardial Antibodies in Rheumatic Fever 278
M. ZACCO, E. M. RICHARDSON, J. O. CRITTENDEN, F. C. DOHAN, and J. L. HOLLANDER: Disposition of Intra-Articularly Injected Hydrocortisone Acetate, Hydrocortisone Free Alcohol and Cortisone Acetate in Arthritis 279
F. NAVAZIO and N. SILIPRANDI: Flavines in Experimental Diabetes 280
W. HOPPE: Zur Mikroabsorptionsspektralanalyse im sichtbaren Spektralgebiet und im UV (Pro Laboratorio) 281

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

- Studiorum progressus: D. D. CHAPMAN, J. M. FELTS, and I. L. CHAIKOFF: Iodine Adsorption Characteristics of Newly-Formed Rat Liver Glycogen 283
Studiorum progressus: H. REICHEL and A. BLEICHERT: Die Dehnbarkeit des Skelett- und Herzmuskels der Schildkröte während der Latenzzeit 286

UNIVERSITY OF MINNESOTA
LIBRARY
NOV 24 '55

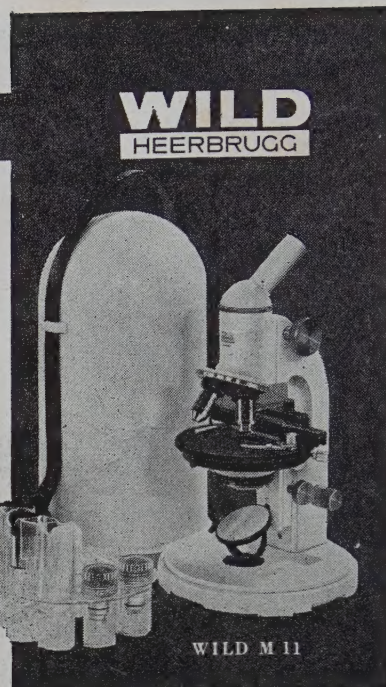
Wild-Mikroskope



WILD M 20

Volle Garantie für
prompten Service
und zuverlässige
Nachlieferung von
Ersatzteilen durch
Schweizer Unternehmen
von Weltruf

Wild Heerbrugg AG., Heerbrugg



WILD M 11

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia XI/7

Birkhäuser Verlag, Basel
Ciba AG., Basel

Ganz & Co., Zürich
Sandoz AG., Basel

Fr. Sauter AG., Basel
Wild Heerbrugg AG., Heerbrugg

Die EXPERIENTIA kann in folgenden Ländern durch die Post abonniert werden:

Des abonnements pour EXPERIENTIA peuvent être commandés près des bureaux de postes des pays suivants:

Italien	Belgien, Luxemburg	Dänemark	Schweden	Portugal
Deutschland	Holland	Norwegen	Finnland	Marokko

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an 36 francs pour la Suisse; pour l'étranger 46 francs. Ces prix s'entendent en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 36.-, im Ausland sFr. 46.-.

Insertionspreise: $\frac{1}{2}$ Seite Fr. 220.-, $\frac{1}{3}$ Seite Fr. 132.- $\frac{1}{4}$ Seite Fr. 77.-. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 36.- per la Svizzera; all'estero sfr. 46.-. I prezzi vanno intesi in valuta svizzera.

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription by inland mail is fr. 36.-; other countries sfr. 46.-. Prices in Swiss currency.

Prices for advertising: $\frac{1}{2}$ page fr. 220.-, $\frac{1}{3}$ page fr. 132.-, $\frac{1}{4}$ page fr. 77.-. Advertisements should be sent to the publishers.

Neuerscheinung aus dem Birkhäuser Verlag



Kleine Technologie des Erdöls

Eine Einführung in die Methoden der Gewinnung und Aufarbeitung der Roherdöle zu Handelsprodukten

von Dr. Heinrich Ruf

Sektionschef an der Eidgenössischen Materialprüfungs- und Versuchsanstalt Zürich

258 Seiten mit 132 Abbildungen und 40 Tabellen. Ganzleinen Fr. 26.- (DM 26.-)

Inhalt: I. Teil: Schürfung – Aufschluss – Produktion – Transport und Lagerung – Erdölproduzenten und Reserven – Roherdöle – Erdölprodukte und ihre qualitätsbestimmenden Eigenschaften. – II. Teil: Physikalische Methoden der Erdölaufarbeitung: Destillation – Kristallisation – Extraktion – Adsorption. – III. Teil: Chemische Methoden der Erdölaufarbeitung: Kracken und Reformen – Gasumwandlungsverfahren – Chemische Nachbehandlung. – IV. Teil: Verarbeitungsschemas – Andere Kohlenwasserstoffquellen – Erdölchemische Industrie. – Der Verfasser gibt auf Grund seiner langjährigen persönlichen Erfahrung mit erdöltechnologischen Problemen in Übersee einen kurzen und möglichst allgemeinverständlich gehaltenen Überblick über diese heute so wichtige und weitverzweigte Industrie.

Zu beziehen durch jede Buchhandlung

BECKMAN

**AUTOMATISCHES
QUARZ-SPEKTROPHOTOMETER**

MODELL

DK-2



- Ultraviolett bis Nah-Infrarot
200-3000 m μ
- Wahlweise lineare Aufzeichnung in
Transmission und Extinktion
- Differentialmessungen an nahezu
gleichen Proben
- Auflösung: 0,3 m μ im UV
1 m μ im Sichtbaren
3 m μ im IR
- Doppelstrahlprinzip kombiniert mit den
Vorteilen des Einstrahlverfahrens
- Empfänger: Pbs-Zellen modernster
Konstruktion. IP28 Photomultiplier
- Wechselstromnetzanschluss 220 V
50 Hz. Eingebaute hochwirksame
Stabilisation

Zuverlässige Beratung und Service
durch eigenes Fachpersonal

Bitte verlangen Sie Prospekt Nr. 377/E

GANZ & Co

BAHNHOFSTR. 40
TEL. (051) 23 97 73

Zürich

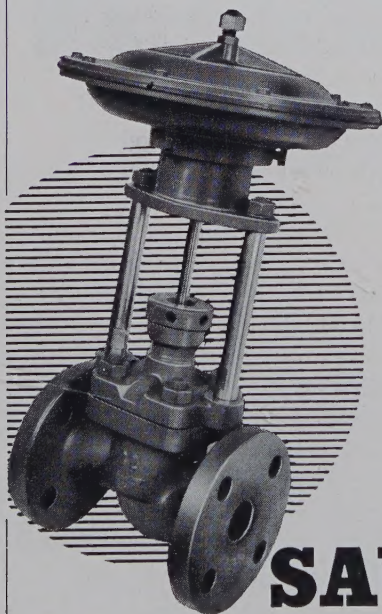
Pneumatische Regelungen für

Heizung

Lüftung

Klima-

anlagen

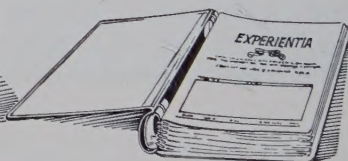


SAUTER

Fr. Sauter AG., Fabrik elektr. Apparate, Basel



EXPERIENTIA
Sammelmappe



Diese Mappe hat den Zweck, die Hefte des laufenden Jahrganges zusammenzuhalten, bevor der komplette Jahrgang gebunden werden kann. Die einzelnen Hefte können mittels einer neuartigen patentierten Haltevorrichtung in die Mappe eingeklettet und im Bedarfsfall wieder herausgelöst werden. Mit dieser geschmackvoll in Kunstleder gebundenen Mappe soll dem Übelstand abgeholfen werden, daß einzelne Hefte im Laufe des Jahres verloren gehen und vor dem Einbinden nachbezogen werden müssen. Die Sammelmappe ist so massiv konstruiert, daß sie ihren Dienst auf Jahre hinaus leisten wird.

Preis in Kunstleder gebunden: Fr. 6.75

BESTELLSCHEIN

An den BIRKHÄUSER VERLAG, BASEL 10 (Schweiz)
Ich bestelle... Sammelmappe(n) zum Preise von Fr. 6.75

Name: _____ Vorname: _____

Ort: _____ Straße: _____

Bitte in Blockschrift schreiben

Das Bild der heutigen Mathematik¹

Von G. KÖTHE², Mainz

Das Bild, das ein der Mathematik Fernstehender von dieser Wissenschaft hat, ist in erster Linie bestimmt durch die Eindrücke und Erfahrungen, die er in der Schule gewonnen hat. Ein grosser Teil dessen, was er dort gelernt oder nicht gelernt hat, besteht aus Erkenntnissen, die bereits die Antike gewonnen hat, ein anderer Teil stammt aus den Anfängen der Neuzeit, so die Differential- und Integralrechnung, als deren Begründer NEWTON und LEIBNIZ gelten, so die analytische Geometrie, die auf DESCARTES zurückgeht.

Damit entsteht der Eindruck, dass zum mindesten diejenigen Teile der Mathematik, die auf der Schule gelehrt werden, sehr altes Gedankengut sind und dass diese Teile der Mathematik für alle Zeiten unverändert festliegen. Welche Ergänzungen kann dieses von der Schule her geprägte Bild bestenfalls noch erfahren haben? Viele haben von der Einstein'schen Relativitätstheorie gehört und vielleicht auch, dass in dieser Theorie eine sehr von der üblichen abweichende Geometrie verwendet wird, die Mitte des vorigen Jahrhunderts der Mathematiker RIEMANN entwickelt hat. Manch einer mag auch noch wissen, dass in der heutigen Atomphysik sehr komplizierte mathematische Hilfsmittel benützt werden, die erst in diesem Jahrhundert erarbeitet wurden.

Schliesslich liest man heute sehr viel über riesige Rechenmaschinen, die mit unvorstellbarer Geschwindigkeit Rechnungen bewältigen, die ihres Umfanges wegen auf anderem Wege nicht geleistet werden könnten. Dies ist aber mehr ein Fortschritt der Technik und bedeutet keine neue Erkenntnis in der Theorie oder, wie man sagt, in der reinen Mathematik. Nur um diese soll es sich bei unserer Betrachtung handeln.

Das Bild, das ein der Mathematik Fernstehender haben wird, ist also das einer sehr weit vollendeten, in ihrem Kern völlig feststehenden Wissenschaft, in der die noch offenen Fragen wohl sehr kompliziert sein werden. Da er solche Fragen nicht kennt, wird er auch annehmen, dass ihre Zahl vielleicht relativ begrenzt sein wird. Ein weiterer Eindruck, den die Schule vermittelt, ist der, dass Mathematik etwas recht Mühsames, mit langwierigen Rechnungen Verbundenes ist. Der Kalkül steht im Vordergrund, und neue Erkennt-

nisse sind meist nur durch langwierige Rechnungen und Kunstgriffe in den Beweisen zu erlangen.

Ist dieses Bild zutreffend? Wenn man diese Frage führenden Mathematikern des ausgehenden 19. Jahrhunderts vorgelegt hätte, so hätten nicht wenige diese Frage im wesentlichen bejaht. Viele Mathematiker dieser Zeit fühlten sich als die Vollender einer von DESCARTES, LEIBNIZ und NEWTON ausgehenden Entwicklung, deren Krönung die im vorigen Jahrhundert entwickelte Theorie der analytischen Funktionen darstellte. Der exakte Aufbau des Begriffs der reellen Zahl durch CANTOR und WEIERSTRASS untermauerte dieses Gebäude der heute als klassisch bezeichneten Mathematik. Man findet auch in den jetzigen Vorlesungsverzeichnissen der Universitäten noch dieses Bild der klassischen Mathematik vorherrschend, die Hauptvorlesungen haben immer noch die Titel Differential- und Integralrechnung, analytische Geometrie, Differentialgleichungen, Differentialgeometrie, Funktionentheorie, die zentralen Themen der klassischen Mathematik. Also selbst ein Student wird im ersten Teil des Studiums dasselbe Bild von der Mathematik haben, das der klassischen Mathematik des 19. Jahrhunderts.

Und doch hat sich im 20. Jahrhundert die Mathematik völlig gewandelt, neue Auffassungen vom Wesen der Mathematik haben sich durchgesetzt, eine neue Blüte dieser Wissenschaft hat begonnen, die Entwicklung neuer Zweige geht in einem Tempo vor sich, zu dem es in früheren Epochen keinen Vergleich gibt.

Bevor ich versuche, Ihnen diese Wandlung deutlich zu machen und zu erklären, lassen Sie mich kurz auf die in manchem analoge Wandlung in der Physik hinweisen, die weit mehr in das Bewusstsein der Allgemeinheit gedrungen ist. Auch hier ist im 20. Jahrhundert ein neues Bild entstanden, man kann hier sogar mit Recht von einem neuen Weltbild sprechen. Kann man die Einstein'sche Relativitätstheorie noch als die Vollendung der klassischen Physik ansprechen, so bedeutet die Quantenmechanik einen völligen Bruch mit dieser klassischen Physik; zur Erfassung der Beobachtungen ist ein völlig neues Begriffssystem notwendig geworden, das nur einem mathematisch Geschulten wirklich zugänglich ist.

Dieses neue Weltbild bereitet sich seit der Jahrhundertwende vor, zum Durchbruch kam es jedoch erst in der Zeit zwischen den beiden Weltkriegen.

¹ Ansprache bei der feierlichen Rektoratsübergabe am 18. November 1954.

² Mathematisches Institut der Universität Mainz.

Es ist eine kaum zufällige Parallele, dass auch die Entwicklung, die zu dem neuen Bild der Mathematik führte, ihren Höhepunkt ebenfalls zwischen den beiden Weltkriegen hatte. Doch sind hier die einzelnen Linien der Entwicklung verschlungener und geben keinen so klaren Einschnitt wie in der Physik.

Die Erschütterung der Grundlagen der klassischen Mathematik fällt in die letzten Jahre des vorigen Jahrhunderts, als sich in einem damals neu entwickelten Gebiet, der sogenannten Mengenlehre, logische Widersprüche zeigten¹. Diese Antinomien betreffen sehr am Rande der Mathematik liegende Fragen und sind aufs engste verwandt mit logischen Paradoxien, die schon im Altertum bekannt waren. Sie schienen weniger die Mathematik selbst als die Logik anzugehen. Es erwuchs der Mathematik jedoch die Aufgabe, sich gegen das Auftreten solcher Widersprüche zu sichern. Die genauere Untersuchung ergab die bestürzende Tatsache, dass die logischen Schlüsse, die zu diesen Paradoxien führten, in der klassischen Mathematik gang und gäbe waren. Es handelt sich dabei vom Standpunkt der Logik aus um ein zirkelhaftes Vorgehen in den Definitionen, es werden etwa Zahlen mit Hilfe von Gesamtheiten von Zahlen definiert, in denen die zu definierende Zahl selbst vorkommt, zum Beispiel die grösste Zahl einer Menge von Zahlen.

Wie war es zu erklären, dass in der strengsten aller Wissenschaften solche Definitionen zugelassen wurden und dass niemand ernstlich die Zulässigkeit dieser Methoden anzweifelte? Der Grund lag in der klassischen Auffassung des Zahlbegriffs, die wir heute auch als die platonistische Einstellung zur Mathematik bezeichnen. – Denken wir etwa an die sogenannten natürlichen Zahlen 1, 2, 3 usw. Wenn wir eine mathematische Frage über diese Zahlen aufwerfen, also ein zahlentheoretisches Problem stellen, so nehmen wir als selbstverständlich an, dass diese Frage eine Antwort besitzt, selbst wenn wir nie imstande sein sollten, sie wirklich zu finden. Wir stellen uns die Zahlen also als in irgendeiner Weise unabhängig von uns gegeben vor. Stellen wir uns auf diesen Standpunkt, dann verschwinden aber auch die Einwände gegen die vorhin als zirkelhaft erkannten Methoden, zum Beispiel die Definition einer grössten Zahl einer Menge von Zahlen. Es hängt also alles davon ab, ob diese platonistische Auffassung, die die mathematischen Gegenstände als etwas von uns unabhängig Gegebenes ansieht, haltbar ist oder nicht.

Die platonistische Auffassung für die allgemeine Mengentheorie, die nicht nur von Zahlenmengen, sondern von Mengen beliebiger Objekte handelt, ist durch das Auftreten der Paradoxien widerlegt. Die Auffassung, dass solche beliebige Mengen als etwas unabhängig von uns Gegebenes, also ideell Existierendes, angesehen werden können, ist unhaltbar. Und damit

ist natürlich auch der platonistische Standpunkt hinsichtlich der reellen Zahlen fragwürdig geworden und somit die Grundhaltung der Mathematiker des 19. Jahrhunderts¹.

Es ist dies das zweite Mal, dass das Problem des Unendlichen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der Mathematik spielt. Zur Zeit der Entstehung der Differential- und Integralrechnung war es das Unendlichkleine. Noch LEIBNIZ fasste die Differentialquotienten als den Quotienten zweier unendlich kleiner Grössen auf, und erst die genaue Analyse des 19. Jahrhunderts zeigte, dass das Unendlichkleine ein in sich widerspruchsvoller Begriff ist und dass die Differentialrechnung ohne das Unendlichkleine aufgebaut werden kann durch die exakte Formulierung des Begriffs des Grenzwertes einer Zahlenfolge.

Bei der Frage, ob man sich die Zahlen als unabhängig von uns gegeben vorstellen darf, handelt es sich dagegen um die Frage der Möglichkeit einer Menge unendlich vieler mathematischer Objekte, also wieder um etwas Unendliches. Ich will die Antwort auf diese Frage vorwegnehmen. Sie ist nicht so eindeutig negativ, wie im Fall des Unendlichkleinen, aber auch nicht eindeutig positiv. Es ist tatsächlich möglich, die natürlichen Zahlen, also die Zahlen 1, 2, 3 usw., ebenso die Brüche, als in ihrer Gesamtheit vorliegend anzusehen. Es ist aber nicht möglich, die reellen Zahlen, also die unendlichen Dezimalbrüche, als in ihrer Gesamtheit gegeben anzunehmen.

Zum Verständnis dieser Antwort ist es nötig, auf die sogenannte konstruktive Auffassung der Mathematik einzugehen. Nachdem man erkannt hatte, dass die platonistische Auffassung der Mathematik zu Widersprüchen führte, musste man eine neue, unanfechtbare Grundlage finden, von der aus man versuchen konnte, die Mathematik neu aufzubauen.

Solange man die Zahlenreihe nicht als fertig gegeben ansieht, also nicht als ein «aktuell Unendliches», wie man auch sagt, sondern nur als konstruktiv beliebig weit fortsetzbar, das heisst als ein «potentiell Unendliches», also etwa jede Zahl als durch eine Anzahl von Kreidestrichen gegeben ansieht, und solange man nur konstruktive Definitionen und Beweise gibt, das heisst solche, die für jede Zahl in endlich vielen Berechnungsschritten durchführbar sind, solange vermeidet man das Unendliche und die logischen Zirkel. Alles, was auf diese Weise aufgebaut werden kann, ist logisch einwandfrei. Man kann nun mit diesen Methoden versuchen, die Mathematik neu aufzubauen, und erhält damit die sogenannte konstruktive Mathematik. Es stellt sich jedoch sehr bald heraus, dass diese konstruktive Mathematik grosse Teile der klassischen Mathe-

¹ Die Mengenlehre einschliesslich der Paradoxien findet man dargestellt bei A. FRAENKEL, *Einleitung in die Mengenlehre*, 3. Aufl. (Springer-Verlag, Berlin 1928).

¹ Eine ausführlichere Darstellung des heutigen Standes der hier behandelten Probleme der Grundlagenforschung gibt A. SCHMIDT, *Mathematische Grundlagenforschung, Enzyklopädie der Mathematischen Wissenschaften*, Bd. I 1, H. 1, Teil II (Teubner, Leipzig 1950). Als Lehrbuch sei erwähnt S. C. KLEENE, *Introduction to Metamathematics* (Amsterdam 1952).

matik nicht mehr enthält und dass eine solche rein konstruktive Mathematik zu unerträglich komplizierten Formulierungen führt.

In dieser, wie es schien, für die klassische Mathematik hoffnungslosen Situation stellte DAVID HILBERT ein Programm auf, das einen Ausweg bot. Einerlei, wie man sich zur erkenntnistheoretischen Möglichkeit der platonistischen Auffassung stellt (vielen Mathematikern erscheint es sinnlos, von einem vom Menschen unabhängigen Gegebenen der Zahlen zu sprechen), vielleicht ist es wenigstens möglich, zu zeigen, dass die platonistische Auffassung in den Grunddisziplinen der Mathematik niemals zu Widersprüchen führen kann, wie sie sich in der Mengentheorie zeigten. In diesen Grunddisziplinen hat sich ja doch niemals bisher ein Widerspruch gezeigt. Dieser Widerspruchsfreiheitsbeweis müsste allerdings mit den unanfechtbaren Methoden der konstruktiven Mathematik geführt werden.

Es ist nun kurz vor dem Zweiten Weltkrieg dem Hilbert-Schüler GENTZEN¹ tatsächlich gelungen, diesen Widerspruchsfreiheitsbeweis für die einfachste mathematische Disziplin, die Zahlentheorie, die Lehre von den ganzen Zahlen, zu führen. Die in der Zahlentheorie vorkommenden Schlüsse, die die ideelle Existenz der ganzen Zahlen voraussetzen, sind dadurch gerechtfertigt; damit ist also der Nachweis geführt, dass für die natürlichen Zahlen die platonistische Auffassung möglich ist.

Für die Lehre von den reellen Zahlen in der bisherigen Form erwies sich ein solcher Widerspruchsfreiheitsbeweis als nicht durchführbar, doch lässt sich wenigstens zeigen, dass die Analysis unter nur geringen Abweichungen von der klassischen Form widerspruchsfrei aufgebaut werden kann. Dieses Ergebnis wurde erst in jüngster Zeit erzielt².

Damit kann die Grundlagenkrise als überwunden gelten. Wie das Unendlichkleine ist damit auch die unendliche Menge als etwas fertig Gegebenes aus der Mathematik ausgeschieden, aber anders als im Fall des Unendlichkleinen kann man sie in gewissen Fällen als unschädliche Fiktion zulassen.

Wenn ich versuche, hier das Bild der heutigen Mathematik im Gegensatz zur klassischen Mathematik des 19. Jahrhunderts zu zeichnen, so musste ich auf die Grundlagenkrise besonders ausführlich eingehen, sie ist ein besonders markantes Zeichen der veränderten geistigen Situation auch in der Mathematik. Sie hat zu einer ganz neuen Einstellung zu den Grundlagen geführt und die engsten Beziehungen zu wichtigen philosophischen Fragen hergestellt.

Die Bedeutung dieser Grundlagenforschung ist übrigens für die Philosophie mindestens die gleiche wie

für die Mathematik. Es ist der Grundlagenforschung zu verdanken, dass die im vorigen Jahrhundert von den Philosophen BOOLE, SCHRÖDER und FREGE begonnene Mathematisierung der Logik in raschem Zuge vollzogen wurde. Aus der Logik, die sich seit ARISTOTELES bis zum vorigen Jahrhundert kaum verändert hat, ist heute eine eigene, in rascher Fortentwicklung begriffene Wissenschaft entstanden von vielleicht noch grösserer Präzision als die Mathematik, die mathematische Logik. Ihre elementaren Teile haben in den modernen Rechenautomaten eine überraschende Anwendung gefunden. Es ist damit möglich geworden, diesen Automaten die Durchführung gewisser logischer Operationen zu übertragen¹.

Die von mir eben skizzierte Entwicklung ist aber nur die eine Seite der tiefgreifenden Wandlung, die die Mathematik seit dem vorigen Jahrhundert durchgemacht hat.

Kennzeichnend für die Mathematik des 19. Jahrhunderts ist die starke Trennung der einzelnen Gebiete voneinander, das Suchen nach Beweisen, die ganz dem Methoden- und Ideenkreis des betreffenden Gebietes entstammen. Es gab natürlich Querverbindungen, es gab auch schon grosse Gebiete, die aus dem Zusammenwirken mehrerer Disziplinen entstanden, so zum Beispiel die analytische Zahlentheorie, in der man Sätze über Primzahlen mit komplizierten Hilfsmitteln aus der Funktionentheorie bewies. Aber im allgemeinen ging die Entwicklung stark in die Richtung des Ausbaus der grossen klassischen Disziplinen und immer stärkerer Spezialisierung.

Blickt man oberflächlich auf die Mathematik von heute, so mag es scheinen, als ob die Spezialisierung sich noch verstärkt hat. Zu den klassischen Disziplinen ist noch eine grosse Zahl neuer Disziplinen getreten, die ebenfalls in rascher Entwicklung stehen. Es scheint, als ob es noch schwieriger geworden sei, eine Ordnung in diese Fülle von Gebieten zu bringen, man hat fast den Eindruck eines regellosen Wucherns von Theorien, die sich immer mehr von den klassischen Fragestellungen entfernen und in denen sich die klassischen Disziplinen verflüchtigen. Blickt man etwas genauer hin, so sieht man jedoch, dass dieser Prozess der Auflösung der klassischen Theorien und das Wachsen neuer Disziplinen nichts anderes ist als der Beginn einer neuen Ordnung des Gesamtgebietes der Mathematik und dass diese neue Ordnung gleichzeitig eine Fülle neuer Probleme freigelegt hat, von deren Existenz die klassische Mathematik nichts wusste. In dieser neuen Ordnung ist allerdings auch der Platz der klassischen Theorien ein völlig anderer geworden. Die Entstehung der klassischen Theorien ist sehr stark historisch bedingt, die Bedürfnisse der Anwendungen

¹ G. GENTZEN, *Die Widerspruchsfreiheit der reinen Zahlentheorie*, Math. Annalen 112, 493 (1936).

² P. LORENZEN, *Die Widerspruchsfreiheit der klassischen Analysis*, Math. Z. 54, 1 (1951).

¹ Einen Überblick über den heutigen Stand der mathematischen Logik geben H. HERMES und H. SCHOLZ, *Mathematische Logik, Enzyklopädie der Mathematischen Wissenschaften*, Bd. I 1, H. 1, Teil I (Teubner, Leipzig 1952).

haben dabei eine grosse Rolle gespielt. In der neuen Ordnung erweisen sie sich als aus recht verschiedenen Komponenten zusammengesetzt und müssen es sich daher gefallen lassen, aufgeteilt zu werden.

Wie ist es zu dieser Neuordnung gekommen und wie sieht sie aus? Ich will versuchen, soweit es im Rahmen eines solchen Vortrages möglich ist, diese Frage zu beantworten.

Es ist ein sehr altes Problem, zu dessen Lösung eine neue mathematische Methode, die sogenannte axiomatische Methode, entwickelt wurde. Schon EUKLID hatte den Versuch gemacht, die Geometrie aus Axiomen aufzubauen, das heisst einige wenige, nicht weiter zu beweisende Sätze über die Punkte, Geraden und Ebenen an die Spitze der Geometrie zu stellen und alle anderen Sätze rein logisch daraus abzuleiten. Die von ihm ausgewählten Axiome waren anschaulich sehr einleuchtend bis auf eines, das Parallelenaxiom, das folgendermassen lautet: Zu jeder Geraden gibt es durch jeden Punkt ausserhalb genau eine Parallele, das heisst eine Gerade, die mit der gegebenen Geraden in einer Ebene liegt und sie nicht schneidet.

Alle Versuche, dieses Parallelenaxiom als Folge der anderen Axiome abzuleiten, misslangen, und es gelang schliesslich im 19. Jahrhundert, zu beweisen, dass eine solche Ableitung tatsächlich unmöglich ist. Man zeigte, dass noch eine zweite Geometrie logisch möglich ist, in der alle anderen Axiome erfüllt sind, nur das Parallelenaxiom nicht; es gibt in dieser Geometrie statt einer immer gleich unendlich viele Parallelen durch einen Punkt.

Man lernte rasch, weitere Geometrien dadurch aufzubauen, dass man weitere Veränderungen an den Euklidischen Axiomen vornahm, und erhielt so plötzlich aus der einen klassischen Euklidischen Geometrie eine Fülle miteinander in engstem Zusammenhang stehender analoger Geometrien. Diese zuerst aus rein mathematischen Überlegungen aufgebauten Geometrien wurden unvermutet für die Physik wichtig; heute weiss man, dass die Geometrie des uns umgebenden Raumes nicht die Euklidische, sondern eine solche neue Geometrie ist¹.

Es ist nun diese axiomatische Methode, deren Anwendung auch auf die übrigen Disziplinen der Mathematik zur Neuordnung der Mathematik geführt hat. Die axiomatische Methode ist noch im vorigen Jahrhundert und am Anfang dieses Jahrhunderts in der Geometrie voll ausgebildet worden, ihre systematische Anwendung auf die übrige Mathematik fällt jedoch erst in dieses Jahrhundert. Wie so oft ist auch diese neue Methode zuerst an einem recht verwickelten Gegenstand, in diesem Fall der Geometrie, entwickelt worden, an dem man zuerst ihre grosse Bedeutung erkannte, und es dauerte noch einige Zeit, bis sie sich

auch in den anderen Gebieten der Mathematik durchsetzte.

Ich will versuchen, an einem Ihnen allen bekannten Beispiel das Vorgehen der axiomatischen Methode anzudeuten.

Das Beispiel ist der Bereich der reellen Zahlen, also der unendlichen Dezimalbrüche, der Grundbereich der klassischen Mathematik. Man kann bekanntlich folgende Operationen mit den reellen Zahlen vornehmen: Man kann erstens die bekannten vier Rechenoperationen ausführen, man kann sie also addieren, subtrahieren, multiplizieren und dividieren. Man kann sie zweitens der Grösse nach vergleichen, und es ist drittens ein Grenzprozess erklärt – so streben etwa die Zahlen 1, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{3}$ usw. nach der Zahl 0.

Der Bereich der reellen Zahlen hat also drei recht verschiedenartige Gruppen von Eigenschaften, und es ist nun naheliegend, jede dieser Gruppen von Eigenschaften gesondert mit der axiomatischen Methode zu studieren.

Man wird also erstens Bereiche studieren, in denen nur die vier Rechenoperationen erklärt sind und den Gesetzen gehorchen, die wir von den reellen Zahlen her kennen, zum Beispiel dem sogenannten kommutativen Gesetz der Addition $a + b = b + a$. Diese Gesetze werden als Axiome der Untersuchung vorangestellt. Ein Bereich von Elementen, in dem eine Addition und Multiplikation erklärt ist, für die diese Axiome gelten, wird als ein Körper bezeichnet. Der Bereich der reellen Zahlen ist also jetzt ein Beispiel für einen Körper. Und man wird sofort weiterfragen: Gibt es noch andere, vom Bereich der reellen Zahlen wesentlich verschiedene Körper? Kann man sie etwa alle aufzählen und durch gewisse zusätzliche Eigenschaften voneinander unterscheiden? Man wird ferner versuchen, eine oder die andere Eigenschaft fallenzulassen, die man von den reellen Zahlen her kennt, man wird zum Beispiel versuchen, zuzulassen, dass ein Produkt $a \cdot b$ Null wird, ohne dass einer der Faktoren Null zu sein braucht. Damit erklärt man neue Typen von Bereichen, die zu den sogenannten Ringen gehören.

Ein besonders einfacher Fall entsteht, wenn man überhaupt nur eine Rechenoperation zulässt, die Multiplikation. Die wichtigsten dieser Bereiche heissen Gruppen, und es hat sich gerade die Theorie dieser Gruppen als ein besonders fruchtbares Gebiet der modernen Mathematik herausgestellt, mit wichtigen Anwendungen in der Atomphysik.

Die Disziplin, in der alle die eben genannten Untersuchungen zusammengefasst sind, nennt man die Algebra. Nun ist die Algebra auch eine der Hauptdisziplinen des 19. Jahrhunderts gewesen, es war aber eine ganz andere Problemstellung als die eben skizzierte, die dieser klassischen Algebra zugrunde lag. Das zentrale Thema der klassischen Algebra war die Auflösung der Gleichungen mit einer oder mehreren Unbekannten. Dieses Problem ist ursprünglich ein reines Rechen-

¹ Das klassische Werk über die Axiomatik der Geometrie ist D. HILBERT, *Die Grundlagen der Geometrie*, 7. Auflage (Teubner, Leipzig 1930).

problem gewesen. Aber schon im vorigen Jahrhundert hatte sich das Interesse stark verschoben, immer mehr trat an die Stelle der faktischen Berechnung der Lösungen einer Gleichung das Bemühen um eine begriffliche Aufhellung der recht verwickelten Struktur der Lösungen. Dieses Ziel ist im 19. Jahrhundert in der Theorie von GALOIS tatsächlich erreicht worden, und diese Theorie wurde das Vorbild für die Untersuchungen der modernen Algebra. In der Galois'schen Theorie traten die ersten Beispiele von weiteren Körpern neben dem Bereich der reellen und komplexen Zahlen auf und die ersten Beispiele von Gruppen. Es geht der Algebra von heute in erster Linie um die Erforschung der begrifflichen Struktur der vielen Bereiche, deren Existenz durch die axiomatische Methode erst entdeckt wurde; die moderne Algebra ist also die Lehre von den Gruppen, Körpern, Ringen usw.¹.

Doch kehren wir zur Analyse des Begriffs der reellen Zahl zurück. Die zweite Gruppe von Eigenschaften waren die Ordnungseigenschaften. Wieder wird man ganz allgemein Bereiche betrachten, für deren Elemente nur eine Beziehung $a \leq b$ erklärt ist und wird eine allgemeine Theorie aller dieser geordneten Bereiche aufzubauen versuchen. Auch dies ist geschehen und hat eine Theorie ergeben, die man als die Theorie der geordneten Mengen bezeichnet. Ihr wichtigstes Teilgebiet ist die Lehre von den Verbänden, einer besonderen Klasse von geordneten Mengen.²

Schliesslich wird eine dritte Theorie, die sich mit den Grenzwertprozessen beschäftigt, zu entwickeln sein; es ist dies die sogenannte Topologie, die heute im Zentrum des mathematischen Interesses steht. Sie beschäftigt sich mit der Untersuchung von allgemeinen Räumen, die man aus den klassischen mehrdimensionalen Räumen entwickelt hat und in denen Grenzprozesse erklärt sind.³

Offenbar sind dies jetzt drei Disziplinen, die in ihren Grundbegriffen wesentlich einfacher sind als die Theorie der reellen Zahlen. Geht man systematisch vor, so hat man also diese drei Disziplinen an die Spitze zu stellen, der Bereich der reellen Zahlen ist dann ein Beispiel eines Bereichs, der allen drei Disziplinen angehört. Er ist nämlich ein Körper, eine geordnete Menge und ein eindimensionaler Raum.

Es hat sich nun gezeigt, dass auch die meisten anderen klassischen Disziplinen Gebiete behandeln, die auf diese drei Disziplinen und ihre Kombination zurückgeführt werden können, so dass man jetzt Algebra, Topologie und Theorie der geordneten Mengen

als die neuen Grunddisziplinen der Mathematik anzusprechen hat. Die Bereiche, die einer dieser Theorien angehören, heissen die Grundstrukturen der Mathematik. Die klassischen Disziplinen handeln von zusammengesetzten Strukturen, ein Beispiel ist die von uns behandelte Struktur der reellen Zahlen.

Die Wandlung der klassischen Algebra zur modernen Algebra vollzog sich zwischen den beiden Weltkriegen. Es waren EMIL ARTIN und EMMY NOETHER, die die Wendung zur axiomatischen Einstellung in aller Schärfe vollzogen. Sie haben damit der Algebra grosse neue Gebiete erschlossen und den Vorrang der rein begrifflichen Methoden vor den rechnerischen Methoden bewiesen.

Es ist heute das Verdienst einer Gruppe französischer Mathematiker, des sogenannten Bourbakikreises, systematisch die Neuordnung der gesamten Mathematik nach den dargelegten Ideen in einem grossangelegten Werk in Angriff genommen zu haben.¹ Dort tritt an die Stelle der bisherigen isolierten Einzeldisziplinen ein nach den verschiedenen Strukturen stufenförmig gegliederter Aufbau der Mathematik. In dieser Neugliederung, die ebenfalls durch eine Tieferlegung der Fundamente erzielt wurde, ist aus der Mathematik wieder ein einheitlich gegliedertes Ganzes geworden.

Ich bin mir bewusst, dass dieser Versuch ein Bild der heutigen Mathematik zu zeichnen, in Vielem mangelhaft ist. Das Bild ist in Wirklichkeit natürlich verwickelter, die von mir gezogenen Linien simplifizieren und vergrößern, auch ist die Sicht sicher einseitig, aber ich glaube doch, dass die Entwicklungslinien, die ich hier aufgezeigt habe, einen sehr wesentlichen Teil des Gesamtbildes wiedergeben.

Summary

The picture of mathematical science which a non-mathematician has, is determined by his experience in school. He will have the opinion that mathematics is a very old science, and he will have some difficulty in understanding that mathematics of to-day is a very rapidly growing science with many new problems. It is the aim of this article to outline some of the ideas which underly the recent development of mathematics. Mathematics of the nineteenth century can be roughly understood as the completion of the ideas of DESCARTES, LEIBNIZ, and NEWTON. The chief domains of this classical mathematics are analysis in its various branches, algebra, number theory and geometry. The wellknown paradoxes in set theory discovered at the end of nineteenth century have led to an entirely new understanding of the foundations of mathematics. The so-called platonic viewpoint, which looks at numbers as entities existing independently of the human mind, is now abandoned, numbers are now considered as existing only

¹ Die Galois'sche Theorie und die neue Algebra findet man dargestellt in B. L. VAN DER WAERDEN, *Moderne Algebra*, Bd. I, 3. Aufl. (Springer-Verlag, Berlin 1950).

² Zur Theorie der geordneten Mengen und Verbände vgl. G. BIRKHOFF, *Lattice theory*, American Math. Soc. Colloq. Publ., Bd. 25 (New York 1948).

³ Die Grundbegriffe der allgemeinen Topologie sind dargestellt bei N. BOURBAKI, *Topologie générale*, Actualités sci. industr. N° 858-1142 (Hermann, Paris 1951).

¹ Dies sind die *Eléments de Mathématique* von N. BOURBAKI, von denen bis heute 17 Bände in der Sammlung *Actualités* (s. Anm. 3 links) erschienen sind. Ein Aufsatz, in dem das Programm der Neuordnung der Mathematik entwickelt wird, stammt von N. BOURBAKI, *The architecture of mathematics*, American math. Monthly 57, 221 (1950).

if they can be constructed in a number of finite steps. This new viewpoint led to many difficulties. The classical disciplines had to be rebuilt. This was only possible by an exact analysis of mathematical thinking; the methods of mathematical logic were developed, by them it was possible to give a proof of the non-contradictory nature of the classical disciplines of mathematics. But this new understanding of the foundations of mathematics is only one side of modern mathematics. The axiomatic method, first developed in geometry, led to a new classification of mathematical notions. The basic disciplines of modern

mathematics are algebra, theory of ordered sets and topology. This is shown by an analysis of the well-known concept of a real number. By reducing every mathematical concept to a few simple basic notions, the so-called elementary structures, the whole of mathematics now appears as a unity, a hierarchy of structures, wherein the classical disciplines and many new branches of mathematics find their places. A group of French mathematicians, under the name of *Bourbaki*, are now writing a systematic exposition of the elements of mathematics from this new viewpoint.

Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

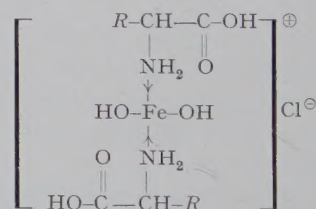
Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. - Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. - Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. - The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Eisen(III)-Komplexe mit 3 ungepaarten Elektronen

Das Fe^{3+} -Ion befindet sich in einem $^6\text{S}_{5/2}$ -Grundzustand und hat daher in allen Salzen und Ionenkomplexen das dem Spin von 5 ungepaarten Elektronen entsprechende magnetische Moment von $5,92 \mu_B$ (μ_B = Bohrsches Magneton). Dasselbe Moment weisen auch Durchdringungskomplexe auf, bei denen keine d -Bahnen des Zentralatoms für die Bindung benötigt werden. Nach PAULING¹ ist dies zum Beispiel der Fall, wenn 4 Liganden mit sp^3 -Bastardbindungen tetraedrisch am Zentralatom verankert sind. Sind dagegen 6 Liganden mit d^2sp^3 -Bastardbindungen in oktaedrischer Anordnung mit dem Zentralatom verknüpft, so bleiben nur noch drei d -Bahnen für die Verteilung der fünf d -Elektronen des Eisen(III)-Ions übrig. Demgemäss wird bei solchen Komplexen, zum Beispiel dem $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, angenähert das magnetische Spinmoment eines ungepaarten Elektrons gefunden². Darüber hinaus könnte das dreiwertige Eisen nach der Paulingschen Theorie auch Koordinationsverbindungen mit 4 Liganden bilden, die durch dsp^2 -Bastardbindungen mit dem Zentralatom verknüpft sind und dementsprechend die Ecken eines Quadrates besetzen. Da in diesem Falle vier d -Bahnen für die fünf d -Elektronen zur Verfügung stehen, ist das Spinmoment von 3 ungepaarten Elektronen, $\mu_{\text{eff}} = 3,87 \mu_B$, zu erwarten. Auf die Existenzmöglichkeit solcher ebenen Eisen(III)-Komplexe schlossen schon CORYELL, STITT und PAULING³ aus der abnehmenden Suszeptibilität des gelösten Methämoglobins im Verlauf der Titration mit Alkali. Einen Wert von $\mu_{\text{eff}} = 3,81 \mu_B$ (22°C) haben interessanterweise MICHAELIS, CORYELL und GRANICK⁴

beim Ferritin erhalten und daraus geschlossen, dass dieses physiologisch wichtige Eisen(III)-Proteid hochmolekulare, kolloidale Eisenhydroxymizellen enthalte.

Als Modellsubstanzen für das Ferritin dargestellte Eisen(III)-Verbindungen neutraler Aminosäuren wurden von BIELIG und BAYER¹ als Komplexe der folgenden Konstitution mit 4 Liganden am Zentralatom erkannt:



R vgl. Tabelle I

Die magnetischen Eigenschaften dieser synthetischen Komplexe und des Ferritins sind in der Tabelle zusammengestellt. Darin bedeuten M_G das Molekulargewicht, χ_{mol} die bei 22°C mit einer magnetischen Waage gemessene molare Suszeptibilität, wobei die diamagnetische Korrektur für den organischen Anteil nach P. PASCAL² berechnet und berücksichtigt ist, und μ_{eff} das daraus berechnete effektive magnetische Moment (Fehlergrenze $\pm 2\%$).

Die für die Eisen(III)-Komplexe II-V der neutralen Aminosäuren gefundenen μ_{eff} -Werte von etwas mehr als 4 Bohrschen Magnetonen liegen in der Nähe des für 3 ungepaarte Elektronen berechneten Spinmoments von $3,87 \mu_B$. Gegenüber der Theorie etwas zu hohe effektive magnetische Momente sind bei Komplexverbindungen von Übergangselementen mit mehr als fünf d -Elektronen keine Seltenheit. Sie werden durch eine nicht voll-

¹ L. PAULING, J. Amer. chem. Soc. 53, 1391 (1931).

² W. BILTZ, Z. anorg. Chem. 170, 161 (1928).

³ C. D. CORYELL, F. STITT und L. PAULING, J. Amer. chem. Soc. 59, 633 (1937). - Siehe auch W. A. RAWLINSON, Australian J. exp. biol. med. Sci. 18, 185 (1940).

⁴ L. MICHAELIS, C. D. CORYELL und S. GRANICK, J. biol. Chem. 148, 463 (1943).

¹ H.-J. BIELIG und E. BAYER, Naturwissenschaften 42, 125 (1955); Chem. Ber., im Druck (1955).

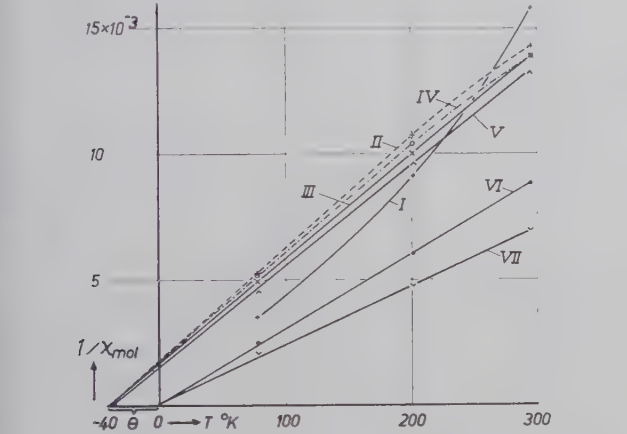
² Zusammenfassung in P. W. SELWOOD, *Magnetochemistry*, S. 52 (Interscience Publishers, New York 1943).

Magnetische Eigenschaften des Ferritins und einiger Eisen(III)-Komplexe von Aminosäuren bei 22°C

Nr.	Verbindung	MG	$\chi_{mol} \cdot 10^6$	μ_{eff}
I	Ferritin	330*	6200	3,84
II	Dihydroxo-dileucino-eisen(III)-chlorid [R = -CH ₂ -CH(CH ₃) ₂] . . .	388	7000	4,08
III	Dihydroxo-diisoleucino-eisen(III)-chlorid [R = -CH(CH ₃)-CH ₂ -CH ₃] . .	388	7200	4,14
IV	Dihydroxo-divalino-eisen(III)-chlorid [R = -CH(CH ₃) ₂]	360	7200	4,14
V	Dihydroxo-dimethionino-eisen(III)-chlorid (R = -CH ₂ -CH ₂ -S-CH ₃) . . .	423	7400	4,20
VI	Dihydroxo-diphenylalanino-eisen(III)-chlorid · HCl (R = -CH ₂ -C ₆ H ₅)	492	11300	5,18
VII	Dihydroxo-dilysino-eisen(III)-chlorid · 7 H ₂ O · 2 HCl [R = -(CH ₂) ₄ -NH ₂]	616	14500	5,87

* Äquivalentgewicht bezogen auf 1 Atom Eisen.

ständige Unterdrückung der Bahnmomente erklärt¹. Ähnliche Werte fanden wir auch für die analytisch nicht völlig rein erhaltenen, in Tabelle 1 nicht aufgeführten Eisen(III)-Verbindungen des Leucylglycins ($\mu_{eff} = 3,95\mu_B$) und der Glutaminsäure ($\mu_{eff} = 3,80\mu_B$).



Temperaturabhängigkeit der molaren Suszeptibilitäten des Ferritins und einiger Eisen(III)-Komplexe von Aminosäuren. Die römischen Zahlen entsprechen den in der Tabelle aufgeführten Komplexen.

Der Eisenkomplex der basischen Aminosäure Lysin [VII] unterscheidet sich nicht nur durch einen Mehrgehalt von 2 Molekülen HCl je Eisenatom von den Komplexen der sauren und neutralen Aminosäuren, sondern auch durch ein magnetisches Moment, das mit dem für die 5 ungepaarten Elektronen von Eisen(III)-Salzen berechneten Spinmoment von $5,92\mu_B$ innerhalb der Messgenauigkeit übereinstimmt. Die Zwischenstellung des Komplexes der aromatischen Aminosäure Phenylalanin [VI], der 1 Molekül HCl je Eisenatom enthält, kommt auch in dem Wert von $\mu_{eff} = 5,18\mu_B$ zum Ausdruck.

Die Verbindungen VI und VII folgen, wie aus dem $1/\chi_{mol}$ -T-Diagramm in der Figur hervorgeht, innerhalb der

Fehlergrenzen dem Curieschen Gesetz. Davon abweichend befolgen die kationischen Koordinationsverbindungen mit 3 ungepaarten Elektronen (II–V) das Curie-Weissssche Gesetz mit Δ -Werten von etwa -40 . Die Temperaturabhängigkeit der reziproken Suszeptibilität des als Neutralkomplex erkannten Ferritins¹ lässt sich hingegen, wie aus Figur 1 hervorgeht, nicht durch eine Gerade darstellen. Derartige Abweichungen vom Curieschen Gesetz, die bei verschiedenen Liganden bzw. Ionen an ein und demselben Schwermetallatom in verschiedener Form auftreten, lassen sich nach VAN VLECK² durch Heisenbergsche Austauschkräfte sowie durch unvollständige Unterdrückung der Bahnmomente erklären.

Die für die Eisen(III)-Komplexe I–V ermittelten magnetischen Momente zeigen, dass in diesen Verbindungen 3 ungepaarte Elektronen je Eisenatom vorhanden sind, woraus nach der Paulingschen Theorie folgt, dass die 4 Liganden die Ecken eines Planquadrates besetzen. Damit ist unseres Wissens erstmals an Substanzen in fester Form gezeigt worden, dass ein und dasselbe Zentralatom magnetisch unterscheidbare Durchdringungskomplexe mit 2 verschiedenen Koordinationszahlen auszubilden vermag.

E. BAYER dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für Gewährung eines Stipendiums und Herrn Dozent Dr. H.-J. BIELIG für anregende Diskussionen. Bei der Ausführung der magnetischen Messungen haben uns die Herren A. ÜBERLE und F. LEIBLE unterstützt.

E. BAYER³ und K. H. HAUSER

Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg, den 4. April 1955.

Summary

Magnetic measurements on iron(III)-complexes of amino acids show that in these compounds, as also in Ferritin, there are 3 unpaired electrons for each iron atom. From this it follows that, according to the Pauling theory, there is a square-planar arrangement of the 4 ligands.

¹ H.-J. BIELIG und E. BAYER, *Naturwissenschaften* 42, 125 (1955); *Chem. Ber.*, im Druck (1955).

² J. H. VAN VLECK, *The Theory of Electric and Magnetic Susceptibilities* (Clarendon Press, Oxford 1932), S. 304.

³ Jetzige Adresse: Biochemische Abteilung des Forschungsinstituts für Rebenzüchtung Geilweilerhof, Siebeldingen (Pfalz).

DISPUTANDUM

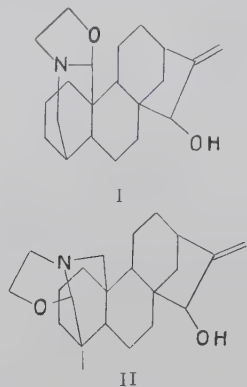
The Basicity and Steric Configuration of the Diterpene Alkaloids Veatchine and Atisine

In a recent paper¹, we suggested that veatchine and anhydrous garryine may be represented by the structures I and II respectively. While the evidence for these

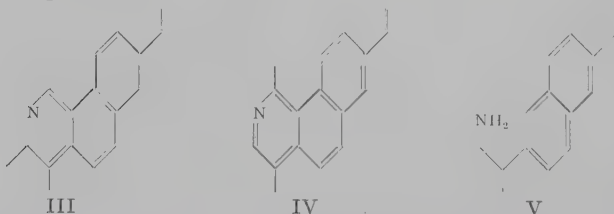
¹ L. PAULING, *Nature of the Chemical Bond* (Cornell University Press, 2. ed. 1948), S. 114.

¹ K. WIESNER, R. ARMSTRONG, M. F. BARTLETT, J. A. EDWARDS, *J. A. C. S. 76*, 4858 (1954); *Chem. and Ind.* 1954, 132.

structures seemed fairly conclusive, the decision as to which of the two formulae belongs to veatchine and which to garryine was based mainly on considerations involving the basicities of the two compounds (veatchine pK_a 11.5; garryine pK_a 8.7) and certain assumptions about the stereochemistry of the skeleton. We have now obtained direct evidence that the assignment of the two formulae is correct. Consequently it is now proper to discuss the reasons for the difference in the basicities of veatchine and garryine, since they have a bearing on the stereochemistry of the skeleton.



We have already reported¹ the preparation of ethyldihydrogarryine by the reaction between anhydrous garryine and ethylmagnesiumbromide and the dehydrogenation of this compound to an azaphenanthrene $C_{18}H_{19}N$. The analogous reaction of veatchine with ethylmagnesiumbromide gave a mixture of products from which a pure compound could not be isolated. We have now repeated these reactions with methylmagnesiumiodide in the hope of obtaining methyldihydroveatchine also. While methyldihydrogarryine was obtained quantitatively as a crystalline substance (m.p. 139–140°C), methyldihydroveatchine was isolated in lower yield only after counter-current distribution of the oily products and crystallization of the picrate (m.p. 216–218°C). Dehydrogenation of methyldihydrogarryine gave an azaphenanthrene $C_{17}H_{17}N$ (m.p. 129°C). The U.V. spectrum of this compound is identical with that of the previously reported azaphenanthrene $C_{18}H_{19}N$ from ethyldihydrogarryine. There are two possible structures (III and IV) for the methyldihydrogarryine dehydrogenation product. It is clear that if garryine is represented by II, the azaphenanthrene derived from methyldihydrogarryine will be III. We have synthesized compound IV by subjecting the N-acetyl derivative of the previously described² compound V to a cyclisation with phosphorus oxychloride, followed by dehydrogenation. The synthetic compound (m.p. 44–45°C) was not identical with the dehydrogenation product of methyldihydrogarryine, which leaves the structure III to be assigned to the latter.



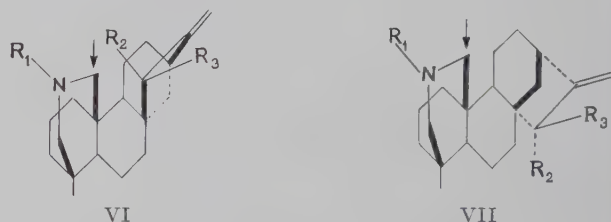
¹ K. WIESNER, W. I. TAYLOR, S. K. FIGDOR, M. F. BARTLETT, J. R. ARMSTRONG, and J. A. EDWARDS, *Chem. Ber. deutsch. Ges.* **86**, 800 (1953).

² M. F. BARTLETT and K. WIESNER, *Chem. and Ind.* **1954**, 542.

The possibility¹ that both garryine and veatchine are represented by the structure II and that the difference between them is due only to the configuration of the carbon carrying the ether oxygen can be invalidated on other grounds².

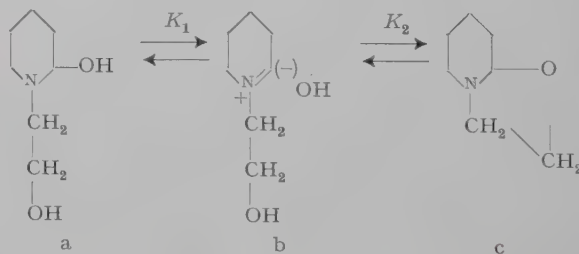
We have also attempted to corroborate these conclusions by subjecting methyldihydroveatchine to a selenium dehydrogenation. However, with the amount of methyldihydroveatchine available only traces of base were obtained. It will become clear from the following discussion that in methyldihydroveatchine the nitrogen ring is strained because of the crowded condition of the methyl-group. Consequently in the dehydrogenation process the nitrogen ring breaks preferentially and only 1-methyl-7-ethyl phenanthrene can be isolated in good yield. We may therefore consider the assignment of structures I and II to veatchine and garryine as established experimentally and turn to the consideration of the different basicities of the two compounds.

There are two possibilities VI and VII for the steric structure of the garrya alkaloids which deserve serious consideration.



Both of these structures have in common that the position marked by an arrow is subjected to strong steric hindrance. In all other steric arrangements there is no appreciable difference in the degree of steric hindrance of the two carbons flanking the nitrogen. It will be shown that the differences in behaviour between garryine and veatchine may be explained in terms of this steric hindrance.

We have first favoured the steric arrangement VI³ on the grounds that in it this steric hindrance is especially large. However it is not possible to assess this aspect quantitatively and the decision between VI and VII has to be made in a different way which is discussed later.



¹ We thank Professor CARL DJERASSI for bringing up this possibility in a discussion at the Sixth Summer Seminar, University of New Brunswick, August 1954.

² Both garryine and veatchine give salts which still retain their different identities as characterized most conveniently by potentiometric titration. The pK value found by titration of garryine and veatchine hydrochlorides are identical with those found by the titration of the free bases. Again, basification of a solution of veatchine and garryine hydrochlorides leads to isolation of pure veatchine and garryine respectively, and not to the isolation of an equilibrium mixture of the same composition in both cases, as might be expected if the above assumption was correct.

³ K. WIESNER, R. ARMSTRONG, M. F. BARTLETT, J. A. EDWARDS, *J. A. C. S.* **76**, 4858 (1954); *Chem. and Ind.* **1954**, 132.

A solution of veatchine or garryine in aqueous media contains an equilibrium mixture of the species *a*, *b* and *c*, represented by partial structures.

Many experiments devised to trap or detect an open chain aldehyde tautomer failed and consequently this species may be neglected in the equilibrium. It is clear that the basicity of garryine and veatchine is a function of the equilibrium constants K_1 and K_2 .

$$K_1 = \frac{[b] \cdot [-OH]}{[a]} \quad K_2 = \frac{[b] \cdot [-OH]}{[c]} \quad (1)$$

The equilibrium between the quaternary hydroxide *b* and the other species is given by equation 2.

$$\frac{[b] \cdot [-OH]}{[a] + [c]} = \frac{K_1 \cdot K_2}{K_1 + K_2} \quad (2)$$

Since $[H^+] \cdot [-OH] = Kw$ we can transform equation 2 into 3.

$$\frac{([a] + [c]) \cdot [H^+]}{[b]} = \frac{K_1 + K_2}{K_1 \cdot K_2} Kw = K_A \quad (3)$$

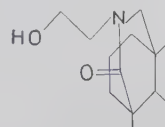
In equation 3, K_A is the titrated acidity of the conjugate acid *b*. Further equation 4 is easily derived and gives the ratio of the carbinolamine and ether forms.

$$\frac{[a]}{[c]} = \frac{K_2}{K_1} \quad (4)$$

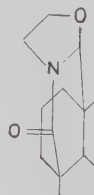
The mechanism of conversion of the quaternary Schiff base *b* into the ether *c* or carbinolamine *a* is obviously an attack of an electron pair of either the oxygen of the primary hydroxyl group or of a hydroxyl

ion on the carbon of the $-C=N-$ group in *b*. From models of garryine and veatchine built on the basis of the stereochemistry given in formulas VI and VII, it is clear that while such an attack is unhindered in garryine, it is subjected to strong steric hindrance in veatchine. This steric hindrance is especially pronounced in the formation of carbinolamine, and smaller in the formation of ether. The carbinolamine form of veatchine is strained and difficult to construct from scale models. If these ideas are now expressed in terms of the two

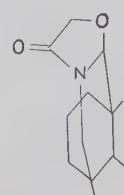
equilibrium constants K_1 and K_2 , it appears that K_1 of veatchine must be much larger than the same constant of garryine, whereas K_2 in veatchine may be only moderately larger than the K_2 of garryine. Equation 3 then shows clearly that veatchine is a stronger base than garryine. Equation 4 gives the ratio between the carbinolamine and ether forms and shows clearly that in veatchine this ratio is shifted in favour of the ether form with respect to garryine. This is in agreement with the various reactions of the two compounds described in our previous communications¹.



VIII



IX



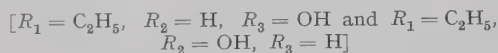
X

Finally it should be pointed out that the different reactivities of garryine and veatchine with methylmagnesiumiodide are caused by the same factors which lead to the difference in the ease of attack on the quaternary forms of garryine and veatchine by a hydroxyl ion.

Another interesting reaction is the conversion of veatchine to garryine by hot alkali. In this medium the quaternary forms of garryine and veatchine are undoubtedly in equilibrium with an ylid ion.

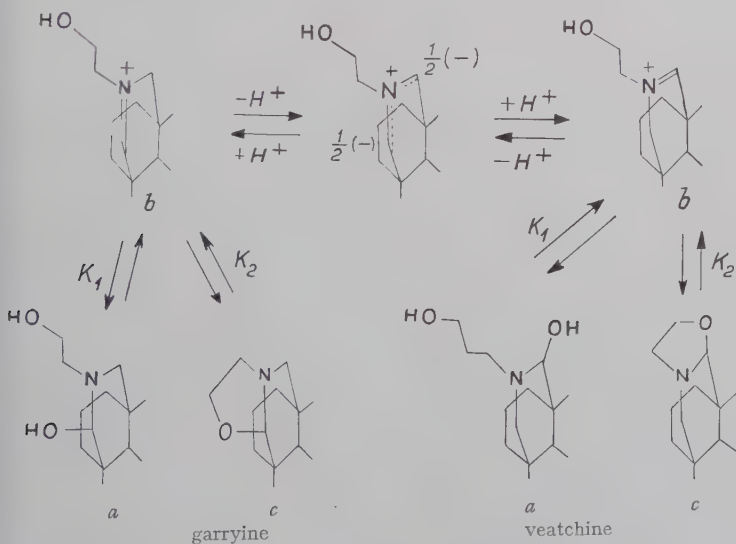
Because of the large concentration of alkali the bulk of the substance will be present in the equilibrium as forms *a* and *c* and only a negligible amount will be present as the quaternary bases *b*. It is therefore obvious that the equilibrium must be shifted toward the sterically favourable forms of garryine and not the strained forms *a* and *c* of veatchine. Thus it is seen that the manifold behaviour of garryine and veatchine may be reduced to a common denominator and is governed by the large steric hindrance of the carbinolamine and similar derivatives of veatchine as compared to garryine.

In order to differentiate between the steric structures VI and VII the two epimeric alcohols represented by VI or VII

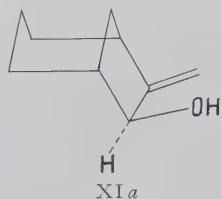


and their acetates were prepared. It is easily seen from models that if structure VI was correct there would be considerably more interaction between a hydroxy or acetoxy group and the nitrogen in one of the two epimers than in the other. On the other hand in the structure VII such an interaction would be negligible in both epimers. The basicities of all four compounds were determined and found to be approximately the same ($pK \sim 7.4$). This

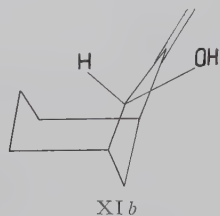
¹ In this connection, the different courses of the permanganate oxidation of veatchine and garryine are especially characteristic. Garryine is oxidised to oxogarryine VIII, while veatchine gives under the same conditions equal amounts of two oxoveatchines IX and X.



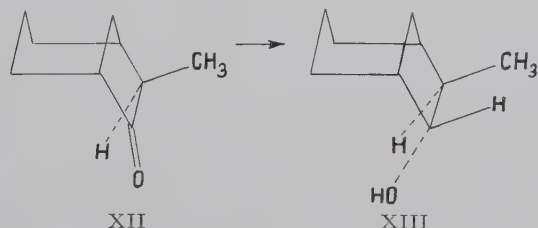
finding leaves us with VII as the more probable steric arrangement. The problem remains now to assign the configuration to the hydroxy group of garryine and veatchine and also to the methyl group in the tetrahydroproducts. The available evidence concerning this matter permits to assign to the hydroxy group of veatchine the configuration given in the partial structure XIa.



At this point we must emphasize that the subsequent considerations are unchanged whether we adopt the stereochemistry VI or VII and consequently only the evidence already cited may serve to choose between the two. Partial formula XIb would depict veatchine if VI was correct.



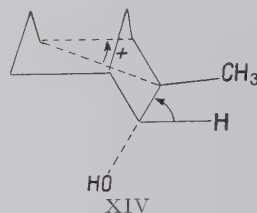
Ketonic derivatives of veatchine obtained either by oxidation of the secondary hydroxy group or by pyrolytic isomerisation of the allylic alcohol into a ketone are reduced by LiAlH_4 to form alcohols with the hydroxy group in the epi-configuration. This can be assumed to take place by approach of the reagent from the less hindered side.



These considerations are borne out by the finding that acetyl derivatives of compounds with the hydroxyl-group in the veatchine configuration (quasi-equatorial) are formed and saponified with greater ease than the corresponding epimers (quasi-axial). The configuration of the methyl-group in various derivatives is the same whether these have been obtained by hydrogenation of the exocyclic double bond or isomerisation of an allylic alcohol¹.

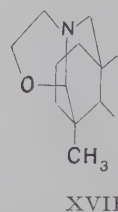
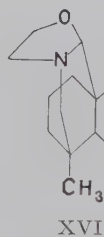
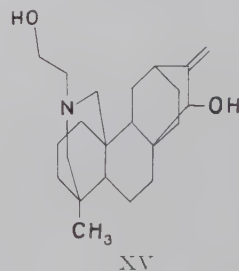
Since compounds possessing the partial structure XII are stable to alkali, they must possess the configuration indicated in this partial structure with the methyl group in the quasi-equatorial position. Finally we should like to mention a reaction which was discovered by DJERASSI and kindly communicated to us. The named author has isolated a compound which he has shown to differ from veatchine only by the configuration of the secondary

hydroxy-group. This epi-veatchine (Laurifoline) isomerizes exceedingly easily with acid into the corresponding ketone (Quachichicine) under conditions where veatchine is stable. It is clear that if our stereochemical assignment is correct it must provide a plausible explanation for this difference. The following explanation has been suggested by WOODWARD¹. In the isomerisation of epi-veatchine the cation XIV is an intermediate.



In this cation the steric arrangement is favourable for elimination of the hydrogen in the manner indicated. Such an opportunity does not exist in the corresponding epimeric cation derived from veatchine. This explanation consequently provides further support of the steric structure assigned to veatchine.

We have some time ago assigned² structure xv to dihydroatisine on the basis of the similarity of most of its chemistry³ to the chemistry of the garrya alkaloids. This implies the arbitrary assignment⁴ of partial structures XVI and XVII to atisine and isoatisine.



Subsequently, PELLETIER and JACOBS⁵ have produced additional evidence in support of these structures. As it is obvious that isoatisine in all its reactions and basicity is analogous to garryine, and atisine to veatchine, we may now assign the structure XVI to atisine and XVII to isoatisine with more confidence.

The isomerisation of atisine into isoatisine by alkali parallels therefore completely the corresponding change of veatchine into garryine the driving force of which has

¹ R. B. WOODWARD, private communication.

² K. WIESNER, R. ARMSTRONG, M. F. BARTLETT, and J. A. EDWARDS, *Chem. and Ind.* 1954, 132 (1954).

³ For a summarising reference see E. S. STERN in R. H. F. MANSKE and H. L. HOLMES, *The Alkaloids*, Vol. 4 (Academic Press Inc., New York, 1955).

⁴ See also M. F. BARTLETT, Ph. D. Thesis, University of New Brunswick, May 1954.

⁵ S. W. PELLETIER and W. A. JACOBS, *J. Amer. Chem. Sci.* 76, 4496 (1954).

¹ This follows clearly from the interrelations given in our last paper (K. WIESNER, R. ARMSTRONG, M. F. BARTLETT, J. A. EDWARDS, *J. A. C. S.* 76, 4858 (1954); *Chem. and Ind.* 1954, 132).

been already discussed. EDWARDS and SINGH¹ have just described a conversion of isoatisine hydrochloride with acetic anhydride into a "triacetate hydrochloride" which on mild hydrolysis with sodium carbonate gives atisine. The change of an iso-atisine derivative which is completely fixed in the quarternary form (b) into an atisine derivative (also fixed in this form) is to be expected as in this case the stabilities will be reversed, the derivative with the trigonal carbon in the more hindered position being more stable. However the triacetate hydrochloride obviously must have been a diacetate hydrochloride with a mole of acetic acid.

Acknowledgements. We wish to thank the John Simon Guggenheim Foundation (κ. w.) and the National Research Council of Canada (J.A.E.) for the award of fellowships, as well as the University of New Brunswick for a leave of absence to one of us (κ.w.). We further express our appreciation to Professor CARL DJERASSI for communicating his work to us prior to publication. Finally it is a pleasant duty to thank Professor R. B. WOODWARD for the hospitality extended to one of us in his laboratory and for a discussion concerning the isomerisation of veatchine and its epimer by acid.

K. WIESNER and J. A. EDWARDS

Converse Memorial Laboratories, Harvard University, Cambridge, Mass. USA, and University of Brunswick, Fredericton, New Brunswick, Canada, February 2, 1955.

Zusammenfassung

Die Basizität und das verschiedene chemische Verhalten der Isomerenpaare Veatchin-Garryin und Atisin-Isoatisin werden mit der sterischen Konfiguration dieser Verbindungen in Zusammenhang gebracht.

¹ O. E. EDWARDS and TARA SINGH, Can. J. Chem. 33, 448 (1955).

Über einen möglichen Weg der Biosynthese der Carotinoide bei *Mucor hiemalis*

In einer früheren Arbeit über die Biogenese der Carotinoide bei *Phycomyces blakesleanus*¹ hatten wir berichtet, dass eine Reihe organischer Säuren in der Lage sind,

¹ W. H. SCHOPFER und E. C. GROB, Exper. 6, 419 (1950).

die Carotinbildung auf einem nichtcarotinogenen Nährmilieu¹ auszulösen. Als aktive Vertreter der Fettsäuren fanden wir die Essigsäure, die Buttersäure und die Palmitinsäure. Unter den Ketosäuren erwies sich als besonders aktiv die Brenztraubensäure, was auch durch ARNAKI und STARY² bei der *Sarcina lutea* bestätigt werden konnte. Unter den Dicarbonsäuren sind Oxalsäure, Malonsäure und Adipinsäure geprüft worden, die alle ausserstande sind, Carotinoide zu bilden. Hingegen ermöglichen die Weinsäure (Oxydicarbonsäure) und Zitronensäure (Oxytricarbonsäure) die Produktion reichlicher Carotinoidmengen.

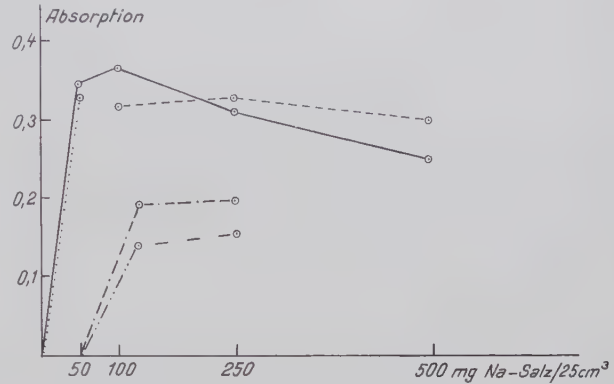


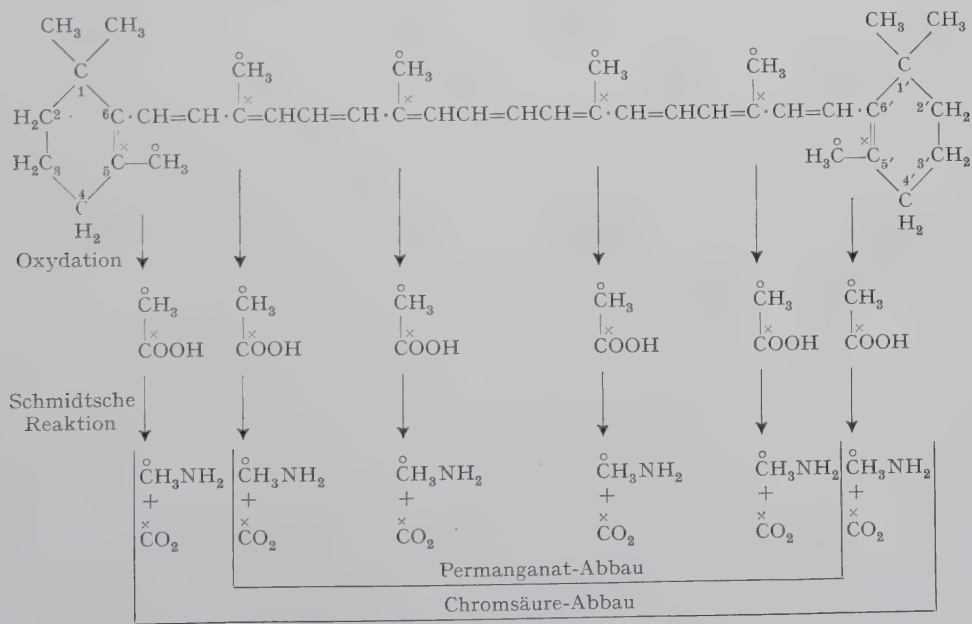
Abb. 1. Die Bildung von Carotinoiden durch verschiedene organische Säuren bei *Phycomyces blakesleanus*.
----- Essigsäure, ... Buttersäure;
———— Brenztraubensäure; — · — · — · Weinsäure;
- - - - - Zitronensäure.
gemessen im Hilger Colorimeter. Filter Ilford 601.

PAECH³ machte es uns zum Vorwurf, die Essigsäure als einzige mögliche Vorstufe der Carotinoide in Betracht zu ziehen, was, wie aus dem oben Gesagten hervorgeht, keineswegs zutrifft.

¹ Wir berichtigen hier, dass auf dem nichtcarotinogenen Laktatmilieu doch sehr kleine Mengen Carotinoide gebildet werden.

² M. ARNAKI und Z. STARY, Biochem. Z. 323, 367 (1952).

³ K. PAECH, VIII^e Congr. int. Bot. Rapports et communications Sect. 11/12, p. 49 (1954).



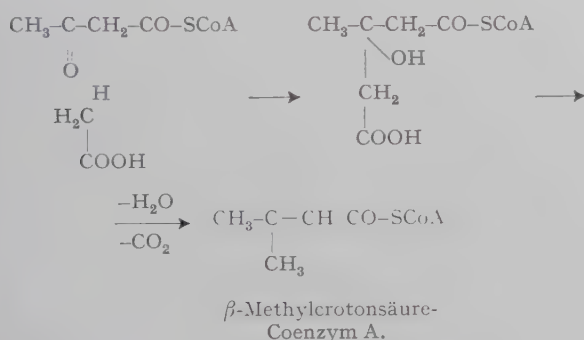
o stammt aus der CH₃-Gruppe der Essigsäure
x stammt aus der COOH-Gruppe der Essigsäure.

standteile des Coenzym A darstellen, haben diese Vermutung bestätigt. Aus diesen Ergebnissen dürfen wir somit auf eine besondere Bedeutung der Essigsäure bzw. des Acetyl-Coenzym A bei der Biosynthese der Carotinoide schliessen.

In diesem Zusammenhang ist es auch von Interesse, in welcher Weise die C-Atome der vom Mikroorganismus zur Verfügung gestellten Essigsäure in das Molekül des β -Carotins eingebaut werden. Zu diesem Zwecke haben wir das in der Nährlösung befindliche Acetat mit $^{14}\text{CH}_3\text{-COONa}$ bzw. mit $\text{CH}_3\text{-}^{14}\text{COONa}$ markiert und aus dem ausgewachsenen *Mucor hiemalis* das radioaktive Carotin isoliert. Das gereinigte, kristallisierte β -Carotin ist oxydativ zu Essigsäure abgebaut worden. Die erhaltene Essigsäure ist sodann mit der Schmidtschen Reaktion zu den entsprechenden C_1 -Komponenten decarboxyliert worden, die auf ihre Radioaktivität hin geprüft worden sind¹.

Die Anordnung der C-Atome der Essigsäure im β -Carotin ist, soweit sie heute experimentell bestimmt worden ist, so, dass offenbar das Essigsäuremolekül als solches eingebaut wird. Zur Zeit sind wir damit beschäftigt, auch die Herkunft der übrigen C-Atome des β -Carotins zu bestimmen.

Alle bis anhin erzielten experimentellen Ergebnisse, die hier kurz zusammengefasst worden sind, führen uns zu der Hypothese, dass die Biosynthese der Carotinoide aller Wahrscheinlichkeit nach über Acetyl-Coenzym A führt und aus dem Fettsäurezyklus nach Lynen abzweigen muss, wie dies das Schema in Abbildung 2 zur Darstellung bringt. Wir betrachten als mögliche Abzweigungsstelle die Stufe des Acetoacetyl-Coenzym A. Man kann sich aus dem Acetoacetyl-Coenzym A die Bildung der β -Methylcrotonsäure, die schon mehrmals als eine niedere Vorstufe der natürlichen Isoprenederivate angesehen worden ist, leicht vorstellen, indem sich ein weiteres Essigsäuremolekül an das Acetoacetat anlagert und das entstandene Zwischenprodukt durch Dehydratisierung und Decarboxylierung in β -Methylcrotonsäure-Coenzym A übergeht.



Andererseits aber haben wir festgestellt, dass auch Säuren des Krebschen Zitronensäurezyklus Anlass zur Carotinbildung geben, wie zum Beispiel die Zitronensäure. Ferner sei auch noch erwähnt, dass wir bei den ersten Versuchen mit markierter Essigsäure² gefunden hatten, dass das β -Carotin aus Kulturen, die auf Acetat als einziger Kohlenstoffquelle gewachsen sind, nur rund 70 % seines Kohlenstoffbestandes aus dem Acetat (CH_3 - und COOH -Gruppe) bezogen hat. Die restlichen

30 % hatten wir, da keine andere Kohlenstoffquelle vorhanden ist, einer Beteiligung des CO_2 der Luft zugeschrieben. Auch diese beiden Erscheinungen stehen nicht im Gegensatz zu der vorerwähnten Hypothese. Durch die Arbeiten von STERN, SHAPIRO, STADTMAN und OCHOA¹ ist gezeigt worden, dass die Zitronensäure in Gegenwart von Coenzym A in Acetyl-Coenzym A und Oxalessigsäure gespalten werden kann. Die Beteiligung des CO_2 der Luft an der Biosynthese der Carotinoide dürfte auch im Zusammenhang mit dem Krebschen Zyklus stehen, indem dort zweimal eine Carboxylierung stattfindet. Da ferner anzunehmen ist, dass ein Teil des in der Nährlösung vorhandenen Acetates in Pyruvat umgewandelt wird, findet auch durch das Pyruvat eine Aufnahme von CO_2 statt, woraus sich dann Oxalessigsäure bzw. Äpfelsäure bildet. Auf dem Wege des Krebschen Zyklus erhalten wir somit Acetyl-Coenzym A, welches seinen Kohlenstoff zum Teil aus CO_2 der Luft bezogen hat.

Wir sind zur Zeit damit beschäftigt, experimentell die hier entwickelten Vorstellungen über den Gang der Biosynthese der Carotinoide, soweit sie noch nicht gesichert sind, zu bearbeiten².

E. C. GROB und R. BÜTLER

Botanisches Institut der Universität Bern, den 8. Februar 1955.

Summary

Our experiments up to now lead us to the hypothesis, that the biosynthesis of carotenoids may be started on acetyl-coenzyme A. The condensation of two molecules of acetyl-coenzyme A leads to acetoacetyl-coenzyme A which can be regarded as the precursor of β -methylcrotonic acid. For a long time the latter compound was postulated as the precursor of the natural isoprene derivatives. The participation of the citric acid cycle in the biosynthesis of carotenoids is discussed.

¹ J. R. STERN, B. SHAPIRO, E. R. STADTMAN und S. OCHOA, J. biol. chem. 193, 703 (1951).

² Diese Arbeiten sind mit der Unterstützung der «Fritz-Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz» ausgeführt worden, der wir unseren besten Dank aussprechen.

A Micromethod for Measuring Photosynthesis

The method elaborated by the author has a sensitivity of the order $10^{-3} \mu\text{l}$ which permits the measurement of the gaseous metabolism in such small objects as single moss leaves a few square millimeters in area or alga filaments a few millimeters long. During the experiment, the plant material can be illuminated with light of known and changeable intensity and can be observed with at least $150 \times$ magnification.

The technique is based on the principle of the capillary tube differential respirometer. The reaction and control chambers (the function of the latter consists in controlling temperature changes), both of the same capacity of about $50 \mu\text{l}$, are made as holes in a 2 mm thick brass plate. The holes are closed from below with a piece of glass fixed with "Araldite" and from above with a glass slide set on a vaseline ring. Two capillaries (with an elliptical bore) with a lumen of about 0.02 mm^2 and length of about 20 cm are fixed with their bend and funnel shaped ends in the immediate vicinity of the holes (Fig. 1).

¹ E. C. GROB und R. BÜTLER, Exper. 10, 250 (1954); Helv. chim. Acta 37, 1908 (1954).

² E. C. GROB, W. H. SCHOPFER und G. G. PORETTI, Int. Z. Vitaminforsch. 23, 484 (1952); W. H. SCHOPFER und E. C. GROB, Exper. 8, 140 (1952).

Time	Time from beginning of measurement min	Position of meniscus in capillary A cm	ΔV_A 0.01 mm	Position of meniscus in capillary B cm	ΔV_B 0.01 mm	$\Delta V_B \cdot I$ 0.01 mm	$\Delta V_A - \Delta V_B \cdot I$	
							• 0.01 mm	• $10^{-3} \mu l$
9.27	0	7.100	0	6.850	0	0	0	0
9.32	5	7.110	+ 10	6.835	-15	-13	+ 23	+ 6
9.37	10	7.140	+ 40	6.830	-20	-17	+ 57	+14
9.42	15	7.165	+ 65	6.845	- 5	- 4	+ 69	+18
9.47	20	7.205	+105	6.860	+10	+ 9	+ 96	+25
9.52	25	7.250	+150	6.885	+35	+30	+120	+31
9.57	30	7.305	+205	6.920	+70	+61	+144	+37

Drops of kerosene introduced to the capillaries serve as index droplets by means of which gas volume changes are measured. Into the bottom of the chamber $25 \mu l$ of carbonate buffer (Warburg Nr. 10) are pipetted. Two leaves of about the same size are placed on a cover slide; one in a drop of water (reaction chamber), the other, having been killed by quick boiling, is dried on the slide and thinly coated with paraffin (control chamber). The slide after being turned over is put on the previously prepared vaseline ring. Thus the leaves are in a hanging drop and not in direct contact with the buffer solution. By applying convenient pressure on the cover slide the index droplets can be manoeuvred to occupy a similar position in the middle of the respective capillaries.

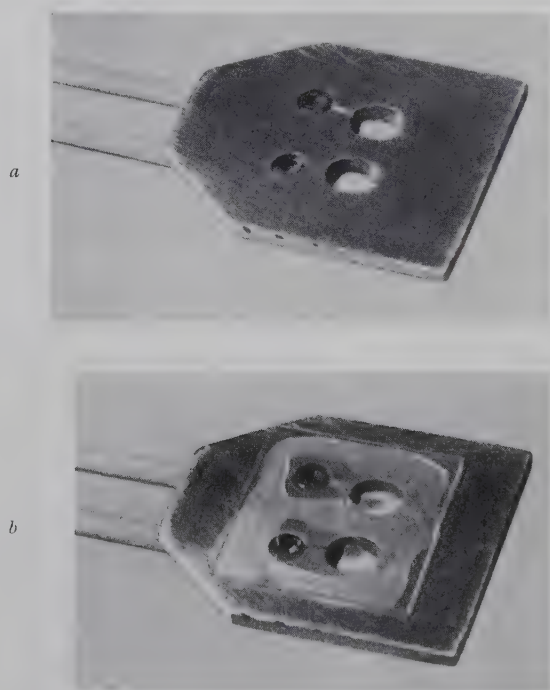


Fig. 1. Brass plate with reaction and control chamber: a open, b closed.

The chambers thus prepared with capillaries are introduced to the compensation chamber with a capacity of about 100 ml, made of sheet brass with a glass window above. This chamber is immersed in a water bath (Fig. 2).

A low power microscope serves to define the position of the index droplets with accuracy of 0.05 mm. A second microscope with a $10 \times$ objective permits direct observation of the investigated plant material.

Both chambers (reaction and control) are illuminated with light which is reflected from the microscope mirror.

When the chambers are illuminated with bright light, although this is passed through 10 cm of liquid cooler, the temperature of the chambers rises. Certain precautions, such as placing the two chambers together in medium which easily conducts heat, illuminating both chambers in the same way, placing a dead leaf of approximately the same absorption in a control chamber, help to ensure that both chambers are heated evenly.

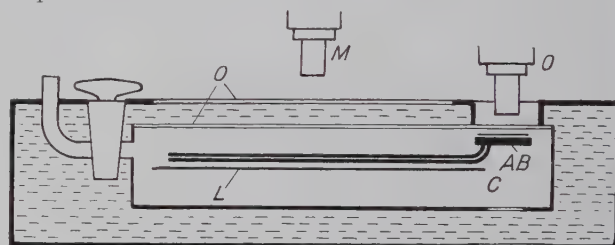


Fig. 2. Scheme illustrating box with water bath. AB plate with reaction and control chambers and capillaries, L Scale, C glass pane for observing the capillaries with microscope M and the chambers with microscope O.

The volume of the liquid phase is the same in both reaction and control chambers, and therefore the changes of temperature give the same differences in the volume of this phase. Differences in the displacement of the index droplet in the two capillaries may arise if the volume of gas phase in reaction (V_A) and in control (V_B) chambers are different. To eliminate this difference, the absolute value of V_A and V_B need not be known, it is sufficient to know the ratio $V_A : V_B = I$. This ratio is determined by measuring the displacement of the kerosene drops in the two capillaries when the air is compressed or decompressed in the compensation chamber. The ratio $D_A : D_B$, where D_A and D_B are the displacements of the drops in the tubes connected with the reaction and compensation chamber respectively, gives the value of I . In the calculation of experimental results, the mean of several determinations of I is used. By multiplying the displacement of the meniscus in the control chamber capillary by I a value is obtained which is exactly comparable with the meniscus displacement in the reaction chamber capillary.

Example of accord. *Funaria hygrometrica*. The area of the two leaves in the reaction chamber 1.68 mm^2 . Area of internal cross section of capillaries 0.0257 mm^2 . Temperature 21° . Coefficient $I = 0.875$. At 9.27 a.m. 480 lux illumination begins.

J. ZURZYCKI

Laboratory of Plant Physiology, Jagellonian University Cracow, Poland, November 3, 1954.

Zusammenfassung

Es wird eine Methode beschrieben, welche die Messung von Photosynthese oder Atmung kleinster Objekte, zum Beispiel einzelner Moosblättchen, erlaubt, mit einer Genauigkeit im Bereich von $10^{-3} \mu\text{l}$. Die verwendete Apparatur, die eine ständige Beobachtung des Objektes gestattet, ist nach dem Prinzip des Differentialkapillarenrespirometers gebaut. Das zu untersuchende Objekt befindet sich in einem hängenden Tropfen, ohne direkten Kontakt mit der Carbonatpufferlösung, die als CO_2 -Quelle dient. Mit Hilfe einer Kontrollkammer und einer besonderen Auswertungsmethode lassen sich durch Temperaturschwankungen verursachte Fehler ausgleichen.

The Dependence of Photosynthesis on the Arrangement of Chloroplasts

Little attention has so far been given to the influence exercised on photosynthesis by the arrangement of chloroplasts, although it has been established that the different positions occupied by the chloroplasts in the plant cell are not without effect on the amount of absorbed light energy (SCHANDERL and KAEMPFFERT¹, ZURZYCKI²). To explain in what way the arrangement of chloroplasts modifies the rate of photosynthesis the course of photosynthesis with simultaneous observation of chloroplast position for 3 species, *Mougeotia* sp., *Funaria hygrometrica* and *Lemna trisulca*, was investigated with the aid of the method described in the foregoing report.

The change from weak light to darkness causes in the cells of *Lemna* or *Funaria* a transition of chloroplasts from a flat position (epistrophe) to the side cell walls (apostrophe). Respiration takes place at an unchanged rate all the time the leaf is in darkness. The movement of the chloroplasts to apostrophe is not connected with any measurable change in the rate of respiration.

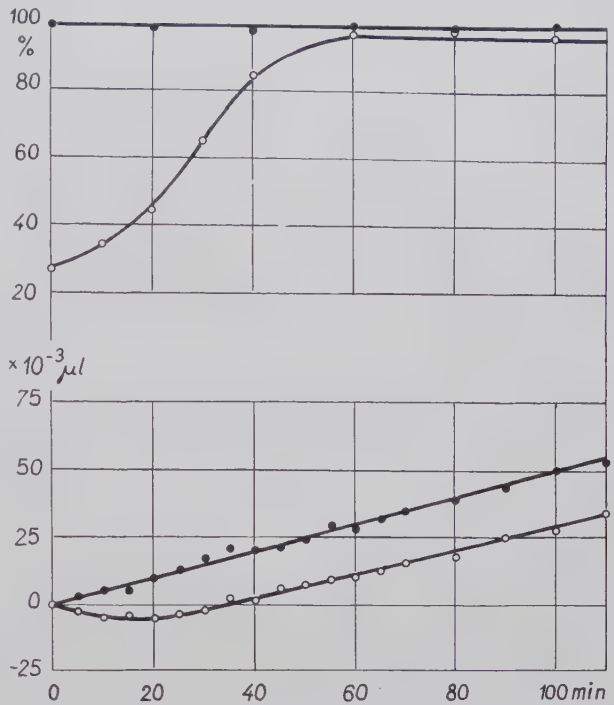
The displacement of chloroplasts from apostrophe to a flat position in weak light had an influence on the rate of photosynthesis. The assimilation is at first markedly lower, quickens after some time and reaches a constant value after 15–30 min. The time when the change of assimilation rate takes place corresponds fairly well with the time when chloroplast arrangement changes. The relation between assimilation and the chloroplast arrangement is extremely well visible in the case of *Mougeotia*. In this alga it is possible in the dark to keep both the flat and profile position of the chloroplast. Figure 1 shows the course of photosynthesis in the same alga filaments when the object is illuminated with light 430 lux after a dark period. In one case the chloroplasts are in a flat, and in the other in a profile position.

Very similar changes in photosynthesis may be observed when the chloroplasts move in weak light to epistrophe from a profile position caused previously by strong light (parastrophe).

When the chloroplasts are in epistrophe, strong light causes their quick movement to a profile position. The rate of photosynthesis does not change during the whole time the strong light acts. The rate of O_2 production is the same in the first minute when chloroplasts are still in a flat position as after 30 min, when all of them are already in parastrophe.

This phenomenon may be explained by the light curve of photosynthesis and the curve recording chloroplast arrangement. The light intensities which cause para-

strophe lie within the range of light intensities which have no further influence on photosynthesis. The movement of chloroplasts from a flat to a profile arrangement is always connected with a change of light absorption, but such a change influences the rate of photosynthesis only in low light intensities when light is the limiting factor (GÓRSKI¹). In strong light, the displacement of the chloroplasts has no such influence.



Mougeotia sp. Total length of filaments approximately 53 mm. Light 430 lux (before in darkness). —●— chloroplasts in darkness in flat, —○— in profile position. Upper curve: The change in the mean area of chloroplast expressed as percentage of cell areas. Lower curve: The oxygen production or consumption in $10^{-3} \mu\text{l}$ in time.

For all 3 investigated species the shape of the light intensity-photosynthesis curve shows some relation to the chloroplast arrangements. As long as the photosynthesis rate increases proportionally to the light intensity the chloroplasts are in epistrophe. Full parastrophe is reached approximately in those light intensities in which a further increase of intensity has no influence on photosynthesis. J. ZURZYCKI

Laboratory of Plant Physiology, Jagellonian University Cracow, Poland, November 3, 1954.

Zusammenfassung

Der Zusammenhang zwischen Chloroplastenstellung und Photosynthese wird durch gleichzeitige Messung des Gasaustausches und Registrierung der Chloroplastenstellung untersucht. Die Bewegungen der Chloroplasten in Dunkelheit haben keinen Einfluss auf die Atmungsintensität. Die Bewegungen, welche im schwachen Licht zur Vergrößerung der Assimilationsfläche führen (Bewegung der Chloroplasten von Profilstellung, hervorgerufen durch Dunkelheit oder starkes Licht, zur Flächenstellung), bringen eine Steigerung der Assimilationsintensität. Dagegen schreitet die Photosynthese im starken Licht mit unveränderter Intensität fort. Sie ist unabhängig von den gleichzeitig verlaufenden Chloroplastenverlagerungen. Die Ergebnisse werden auf Grund des Minimumgesetzes diskutiert.

¹ H. SCHANDERL und W. KAEMPFFERT, *Planta* 13, 700 (1933).

² J. ZURZYCKI, *Acta Soc. Bot. Pol.* 22, 299 (1953).

¹ F. GÓRSKI, *Acta Soc. Bot. Pol.* 22, 1 (1953).

Water Content in Vacuolated Liver

In a previous paper¹ on some aspects of the metabolism of vacuolated cells, the hypothesis was formulated that the vacuole formation, at least in the rat liver, is not necessarily connected with an increased water content of the cells. In fact, the vacuolated cells did not appear to differ in size from the normal ones, and, on the other hand, no modification of the total water content was observed in vacuolated livers. However, there was the possibility that an irregular water distribution between the extra- and intracellular phases existed, with a probably increased intracellular water content and a correspondingly diminished size of the extracellular phase.

Further findings² showed that the treatment adopted to obtain cellular vacuolation *in vivo* (keeping the rats in an atmosphere of 97% nitrogen and 3% oxygen) when applied *in vitro* on rat liver sections caused a lowered Q_{O_2} and an increased water content, without any appreciable vacuolation.

It seemed therefore justified to extend our researches to the water distribution in the extra- and intracellular phases of normal and vacuolated rat livers.

Adult albino rats, previously starved for 16–20 h, were used throughout our experiments. The vacuolation in the liver cells was obtained by the usual technique, that is by keeping the rats in a continuously renewed atmosphere of $N_2 + 3\% O_2$ for 2 h (PICHOTKA³).

Blood serum samples were obtained by heart puncture under slight ether anesthesia, just before killing the animals.

The rats were killed by decapitation. The livers were quickly removed, gently squeezed on blotting paper and immediately weighed.

The H_2O and Cl^- content of the livers and sera were determined and calculated on the basis of fat-free fresh tissue, in order to eliminate variations due to different fat content of the tissues from animal to animal.

For the determination of the water content, weighed samples of tissue and serum were heated in an oven at $103^\circ C$ to reach constant weight. The total water content was calculated as the difference between wet and dry weight.

In order to remove neutral fat, the dried tissues were extracted with ether for 5–6 h, and then left overnight in petroleum ether (b.p. $40-60^\circ C$). The organic solvent remaining in the tissues was evaporated off by heating in an oven at $103^\circ C$. The weight after extraction was taken as the weight of the fat-free solids in the samples. For the Cl^- determinations, the fat-free dried tissues were powdered, to ensure uniform sampling.

Chlorine was determined by the WILSON and BALL method⁴.

According to the formulae proposed by HASTINGS and EICHELBERGER⁵ and successfully used by POPJÁK⁶ in studying the mechanism of parenchymatous degeneration (cloudy swelling), the values of chlorine and water content in liver and serum were used to calculate the size of extracellular phase (g/kg fat-free fresh tissue) and the water content of the intracellular phase (g/kg intracellular phase) of the liver.

Table.—Extracellular phase and water content of intracellular phase in normal and vacuolated rat livers.

	Serum Cl^- (mEq/kg)	Serum H_2O (g/kg)	Liver Cl^- (mEq/kg fat-free tissue)	Liver H_2O (g/kg)	Extracellular phase (g/kg)	H_2O in intracellular phase (g/kg intracellular phase)
Normal animals						
1	103	925	38.8	676	343	585
2	110	928	35.8	717	298	634
3	99	902	41.8	716	350	602
4	99	922	32.1	702	290	620
5	101	915	37.0	700	324	609
6	102	920	38.7	707	336	595
7	112	936	33.0	716	379	560
8	105	918	40.0	703	337	570
9	106	921	32.0	692	266	594
10	99	931	34.0	705	309	695
Mean	—	—	—	703.4	323.2	606.4
s.e.m.	—	—	—	± 4.0	± 10.4	± 12.0
Hypoxic animals						
1	101	922	37.8	710	333	614
2	109	924	36.8	703	300	604
3	100	927	33.0	703	294	604
4	104	924	37.6	705	320	585
5	106	918	39.4	718	329	621
6	98	933	34.6	706	316	607
7	100	929	42.9	707	382	594
8	97	932	38.1	685	353	593
9	103	933	33.0	707	347	585
10	97	936	26.5	708	245	634
Mean	—	—	—	705.2	321.9	604.1
s.e.m.	—	—	—	± 2.6	± 12.0	± 5.0
t	—	—	—	0.38	0.26	0.56
P	—	—	—	$0.8 > P > 0.7$	$0.8 > P > 0.7$	$0.6 > P > 0.5$

The results are shown in the Table.

The total water content, the chlorine space (or extracellular phase) and the water content of the intracellular phase are not significantly different in normal and treated animals. Therefore, as no increased hydration can be noted in the experimentally vacuolated liver cells, we cannot consider vacuolar degeneration as closely associated with hydropic degeneration.

As already noted, surviving rat liver sections, in the Warburg apparatus, take up water when kept in hypoxia (gas phase: $N_2 + 3\% O_2$): but in living animals conditions seem to be altogether different. This difference is to be emphasized, as some information on vacuolar degeneration is derived from studies on isolated cells.

This work has been supported by research grants from the *Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori*.

MARIA BASSI and A. BERNELLI-ZAZZERA

Institute of General Pathology, University of Milan, February 11, 1955.

Riassunto

È stata studiata, nel ratto, la distribuzione dell'acqua nelle fasi extra- ed intracellulare in fegati normali e vacuolizzati.

Nessuna variazione del contenuto in acqua è stata notata nei fegati in degenerazione vacuolare.

¹ M. BASSI and A. BERNELLI-ZAZZERA, *Exper.* 11, 105 (1955).

² A. BERNELLI-ZAZZERA and M. BASSI, *Lo Sperimentale* (in press).

³ J. PICHOTKA, *Beitr. Path. Anat.* 107, 117 (1942).

⁴ D. W. WILSON and E. G. BALL, *J. Biol. Chem.* 74, 221 (1928).

⁵ A. B. HASTINGS and L. EICHELBERGER, *J. Biol. Chem.* 117, 73 (1937).

⁶ G. POPJÁK, *J. Path. Bact.* 60, 75 (1948).

Über organische Fungizide
Sulfonamid-Derivate¹

Zur Bekämpfung von Pilzkrankheiten im Pflanzenschutz wurden ursprünglich anorganische Fungizide in Form von Cu-, S- und Hg-Verbindungen verwendet. Später wurden organische Metallverbindungen, zum Beispiel Dithiocarbamate² entwickelt, denen rein organische Präparate, wie Chinone³, Glyoxalidine⁴ und Derivate von Dicarbonsäureimiden⁵ folgten.

Bei der Bearbeitung von analogen Präparaten zu den Dicarbonsäureimid-Derivaten wurden aus der Gruppe der Sulfonamide einige Derivate mit guten fungiziden Eigenschaften gefunden, unter denen die folgenden 3 Verbindungen⁶ besonders von Interesse sind:

Die Präparate zeigten praktisch keine insektizide und akarizide Wirkung und erwiesen sich auch gegen Bienen als ungefährlich.

Zur Prüfung der fungiziden Wirkung wurden Labor-, Gewächshaus- und Freilandversuche durchgeführt im Vergleich zu Präparaten, die gegen die entsprechenden Pilze praktische Verwendung finden.

Für die Laborversuche wurde ein Objektträgertest an 12 verschiedenen Pilzsporen bonitiert sowie ein Sellerieblatt-Test mit *Septoria apii* ausgewertet (Tab. I).

Die Gewächshausversuche erfolgten an eingetopften Reben mit *Plasmopara viticola* (Tab. I).

Die Freilandversuche (Tab. II), durchgeführt mit Spritzpulvern in verschiedenen Gegenden der Schweiz, erstreckten sich auf *Plasmopara viticola* und *Uncinula necator* an Reben, *Venturia inaequalis* und *Podosphaera*

Nummer	G 24 409	G 24 505	G 26 156
Allgemeine Bezeichnung	Chlorsulfan	Norsulfan	Mesulfan
Chemische Bezeichnung	Chlormethansulfon-N-trichlormethansulfonylanilid	Methansulfon-N-trichlormethansulfonylanilid	Methansulfon-N-trichlormethansulfonyl-4-chloranilid
Summenformel	C ₈ H ₇ O ₂ NCl ₄ S ₂	C ₈ H ₈ O ₂ NCl ₃ S ₂	C ₈ H ₇ O ₂ NCl ₄ S ₂
Strukturformel	<chem>Cl-CH2-SO2-N(c1ccccc1)S(=O)(=O)C(Cl)(Cl)Cl</chem>	<chem>CH3-SO2-N(c1ccccc1)S(=O)(=O)C(Cl)(Cl)Cl</chem>	<chem>CH3-SO2-N(c1ccc(Cl)cc1)S(=O)(=O)C(Cl)(Cl)Cl</chem>
Schmelzpunkt	133–134°	114–115°	113–114°

Bei allen 3 Verbindungen stellen die technischen Produkte kristalline, gelbliche Pulver dar, deren Gehalt rund 98 % beträgt; die chemisch reinen Verbindungen kristallisieren in farblosen Nadeln. Sie sind in Wasser praktisch unlöslich, leicht löslich in organischen Lösungsmitteln wie Azeton, Chloroform, Xylol; mässig löslich in Alkoholen. Gegenüber Säuren sind sie beständig, während mit Alkalieine langsame Zersetzung eintritt.

Über die Toxizität⁷ liegen bisher Bestimmungen der DL 50 per os an Mäusen und Ratten sowie Resultate subchronischer Verabreichung der chemisch reinen Präparate während 4 Wochen an Ratten per Schlundsonde vor (für Chlorsulfan und Mesulfan wurden pro Konzentration je 5 Tiere, für Norsulfan je 20 Tiere verwendet):

leucotricha an Apfelbäumen, *Phytophthora infestans* an Kartoffeln, *Septoria apii* an Sellerie und *Puccinia antirrhini* an Löwenmäulchen.

¹ 1. Mitteilung.
² J. G. HORSFALL, *Fungicides and their Action* (Waltham, Mass., USA., 1945). – W. H. TISDALE und A. L. FLENNER, Contr. Boyce

Thompson Inst. 16, 303 (1952). – S. E. A. Mc CALLAN, Agr. Chemicals 1, 15 (1946).
³ G. L. Mc NEW und H. P. BURCHFIELD, Contr. Boyce Thompson Inst. 16, 357 (1952). – R. J. W. BYRDE und D. WOODCOCK, Ann. Appl. Biol. 40, 675 (1953). – R. W. MARSH, Nature 167, 97 (1951).
⁴ R. H. WELLMAN und S. E. A. Mc CALLAN, Contr. Boyce Thompson Inst. 14, 151 (1946). – H. MARTIN, Manufacturing Chemist, Februar, 51 (1953).
⁵ A. R. KITTLESON, Science 115, 84 (1952). – M. LAFON, Le traitement du mildiou de la vigne sans cuivre. Acad. Agric. France, Séance 20 février, 1952. – S. BLUMER und J. KUNDERT, Landw. Jb. Schweiz, 68, 267 (1954). – H. DARPOUX, Phytiatric-Phytopharm. 2, 13 (1952).
⁶ Zum Patent angemeldet bzw. durch Patente geschützt.
⁷ Wir danken Herrn Prof. DOMENJOZ für die Überlassung der Resultate.

Toxizität	Chlorsulfan	Norsulfan	Mesulfan
Akut: DL 50 Maus per os	> 5 g/kg	> 5 g/kg	> 5 g/kg
DL 50 Ratte per os	> 5 g/kg	> 5 g/kg	> 5 g/kg
Subchronisch, überlebende Tiere			
bei 500 mg/kg	—	100%	—
bei 1000 mg/kg	—	90%	—
bei 1250 mg/kg	100%	—	—
bei 2500 mg/kg	100%	—	100%
bei 5000 mg/kg	—	—	100%

Tabelle I. Labor- und Gewächshausversuche.

Produkt (Aufarbeitung)	Bonitierte Wirkung					
	Objektträger- test 1–0,01% AS	im Sellerieblatt-Test			im Reben-Test	
		0,25	0,1	0,01% AS	präventiv 0,125–0,025%	kurativ 0,05–0,025%
Chlorsulfan	6,4 a)	98,5	85	58	100	14,6
Norsulfan	4,9	100	35	25	100	10,4
Mesulfan	6,5	100	100	67	100	0
Captan	6,1	100	95	80	100	12,5
Captan (50 WP) b)		100	100	89		
Zineb (65 WP) c)		100	79	69		

a) 0 = keine Wirkung, 9 = maximale Wirkung;
b) Common name für N-Trichlormethylthiotetrahydrophthalimid. Anw. Konz. 2, 0,4, 0,08%.
c) Common name für Zink-äthylen-bis-dithiocarbamat. Anw. Konz. 2, 0,4, 0,8%.

Tabelle II. Freilandversuche.

Produkt	durchschnittlich bonitierte Wirkung	
	Reben (<i>Plasmopara viticola</i>)	Apfelbaum (<i>Venturia inaequalis</i>)
Chlorsulfan a)	68–98	64–78
Norsulfan a)	41–97	70–80
Mesulfan a)	76–99	88–94
Captan a)	56–99	86–94
Bordeauxbrühe b)	95	
Kupfer-Zineb Kombination c)	97	
Kupferoxychlorid + Ultraschwefel c)		70–87
Glyodin-Präparat c)		75

a) aufgearbeitet zu 50% «wetable powder»; 125 g AS auf 100 l Brühe; b) Anwendung 1%;
c) Anwendungskonzentration nach Angabe des Herstellers.

Sowohl die Gewächshaus- wie die Freilandversuche zeigten, dass die 3 Substanzen an den behandelten Pflanzen keine phytotoxischen Nebenerscheinungen bewirken, sondern im Gegenteil das Wachstum und die Fruchtentwicklung günstig beeinflussen.

Das fungizide Wirkungsspektrum der 3 Substanzen scheint sich zu decken und ist nicht so breit wie das anorganischer Fungizide, vor allem der Cu-Präparate. Wie die Freilandversuche zeigen, kommen diese Präparate zur Bekämpfung der wichtigsten Pilzkrankheiten im Weinbau (*Plasmopara viticola*)¹ und Obstbau (*Venturia inaequalis*) in Frage. Gegen *Phytophthora infestans* auf Kartoffeln und *Septoria apii* übten sie eine gewisse Wirkung aus; bei der unter europäischen Verhältnissen üblichen Spritzfolge scheint die Dauerwirkung jedoch gegen die beiden letztgenannten Pilze ungenügend zu sein. Die übrigen Anwendungsgebiete müssen durch Feldversuche weiter abgeklärt werden².

Von den 3 Präparaten scheint nach den bisher vorliegenden Versuchsergebnissen Mesulfan am interessantesten zu sein.

R. WAEFFLER, R. GASSER,
A. MARGOT und H. GYSIN

Aus den Forschungslaboratorien der J. R. Geigy AG.,
Basel, den 18. April 1955.

¹ D. BOUBALS, A. VERGNES und H. BOBO konnten unsere Resultate mit Chlorsulfan bestätigen. (Essais de Fongicides organiques dans la lutte contre le mildiou de la vigne effectués en 1954. Progr. agric. vitic., Montpellier 1955.)

² Über Untersuchungen in den USA., die unsere Ergebnisse bestätigen, wird Mc NEW in den Contr. Boyce Thompson Inst. berichten.

Summary

A new group of organic compounds was tested with several laboratory methods, in the green-house and against different fungus diseases in the field. According to these tests the described sulfonamide derivatives show a fungicidal activity comparable to compounds which are actually used. So far Mesulfane seems to be the most promising compound.

Enzyme Levels in the Growing and Regressing Flexner-Jobling Carcinoma

Little is known about the enzymic pattern of spontaneously regressing tumors as compared to the enzyme levels in tumors still increasing in growth. Such a study seemed to us all the more interesting since it might eventually offer a basis of comparison for the enzymic changes occurring in tumors following induced regression by various therapies or radiation. The Flexner-Jobling rat carcinoma¹ having regularly a 35 to 40 per cent rate of spontaneous regression proved extremely suitable for this investigation. Generally speaking, once this tumor has been implanted into the subcutaneous tissue of the rat, its course may follow any of the following three directions:

(1) It may grow to a maximal weight of about 35 g finally causing the death of its host.

¹ K. SUGIURA and C. S. H. STOCK, Cancer 5, 382 (1952).

(2) It may cause necrosis of and break through the skin at an earlier stage, between the 15th and 30th day after implantation. In this case the rats usually recover. Deaths from secondary infections are rare. The tumor will disintegrate by necrosis and be replaced by scar tissue.

(3) Regression of the tumor may start any time between the 14th and 30th day.

In the present study we have focused our attention on three enzymic activities: Catheptic activity, acid phosphatase and alkaline phosphatase. Catheptic activity has been estimated by the liberation of tyrosin from hemoglobin¹ while phosphatase activity was calculated from the amount of phenol liberated from phenylphosphate². In both instances, the modified Folin method of LOWRY and his associates³ was used, employing in the first a tyrosin standard and in the latter a phenol standard curve⁴. Representative assay systems are given at the foot of Table I and II.

The areas of the tumors were measured with calipers at three days' intervals. This method made it inevitable that by the time a tumor had been clearly recognized as regressing, it had lost already a substantial part of its former tissue. The values given, therefore, refer to tumors already well past their initial regression stage. After excision from the rat carcass they were washed in isotonic ice-cold KCl, dissected and, as far as possible, the non-necrotic tissue, usually the outer layer, was used.

As shown in Table I there is a sharp rise in catheptic activity in the regressing tumors as compared to the non-regressing ones. However, in neither group is there a direct relationship between tumor size and enzyme activity. We have, however, given a breakdown of the activities in each group for the better understanding of their distribution. The remarkable increase in catheptic activity in the course of regression may be an intrinsic part of a process, an "autolysis *in vivo*" by which the tumor protein is broken down and removed. It clearly emerges from the data presented that the highest activities observed in non-regressing tumors are well below the lowest activities in the regressing ones.

The results with the phosphatases are summarized in Table II. Whereas the acid phosphatase is not subjected to any significant changes, it is the activity of the alkaline phosphatase which is markedly decreased in regressing tumors; there is also evident a tendency towards lower alkaline phosphatase activity in the initial stage of tumor growth. We have expressed those changes as the phosphatase ratio (column 4). In non-regressing tumors past their ninth day of growth there was only one instance when it was as low as 0.9; in regressing tumors, on the other hand, the highest value obtained was 0.6, also in one instance only. It is noteworthy that in tumors starting their regression between the 14th and the 20th day (the minority) the above ratio was found to be 0.4 on the average, whereas it averaged 0.18 in tumors regressing between the 20th and 30th day. (In the Table the tumor activities have been grouped according to their ranges and not according to the age of the tumors.)

Alkaline phosphatase in regressing tumors thus seems to go through a maximum: It is low in the initial stage, increases with the growth of the tumor and then again decreases to its lowest activity once the tumor regresses.

¹ M. E. MAVER, A. E. GRECO, E. LOVTRUP, and A. J. DALTON, J. Nat. Cancer Inst. 13, 687 (1952).

² R. IWATZURU, Bioch. Z. 173, 384 (1926).

³ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL, J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).

⁴ W. KOPFERHAAR, Z. Anal. Chem. 15, 233 (1876).

Table I.—Average Catheptic Activities.

Number of tumors	Activity	Weight range in grams	Description of implant
20	220	0.61–30	Growing tumors between the 6th and the 38th day
13	336	0.23–6.8	
3	435	0.98–8.5	
Average of 36	276		
7	1613	0.040–1.6	Regressing tumors between 15th and 38th day
12	1194	0.070–0.96	
9	748	0.014–1.12	
Average of 28	1136		

Activities are expressed as micrograms of tyrosine liberated in one h per mg of homogenate-N. The assay system contained in 5 ml of 0.1 M acetate buffer, pH 3.5, hemoglobin corresponding to 18 mg of protein-N (approximately a 2.5 per cent solution of hemoglobin) to which was added 1 ml of tumor homogenate corresponding to amounts ranging between 2.5 and 0.8 mg of homogenate-N. (Enzymatic activity in this interval is linear.) Incubated for 30 minutes at 37°C. Incubation terminated by addition of 1 ml of 49 per cent trichloroacetic acid.

Table II.—Alkaline and Acid Phosphatase Activity.

Number of tumors	pH 4.5	pH 9.4	Phosphatase ratio*	Description of implants
1	475	92	0.19	Growing tumors between 6th and 7th day. Range of weight: 0.18–0.89 g
9	459	283	0.61	
2	524	508	0.96	
Average of 12	474	304	0.64	
9	472	464	0.98	Growing tumors between 9th and 38th day. Range of weight: 1.02–30 g
10	434	627	1.44	
6	346	785	2.26	
Average of 25	426	606	1.42	
4	628	27	0.04	Regressing tumors between 15th and 38th day. Range of weight: 0.14–1.60 g
9	581	153	0.26	
5	555	298	0.53	
Average of 18	584	165	0.28	

* Expressed as alkaline phosphatase activity or acid phosphatase activity. Activities are expressed in micrograms of phenol liberated from phenylphosphate per milligram of tumor homogenate-N in one hour. The assay systems were as follows:

(a) *Acid phosphatase*. 5 ml of 0.1 M acetate buffer, pH 4.5, contained 2.181 mg of phenylphosphate. 1 ml of tumor homogenate was added, corresponding to amounts ranging from 0.9–1.2 mg of homogenate-N. Incubated 10 minutes at 37°C.

(b) *Alkaline phosphatase*. 5 ml of 0.025 M veronal buffer, pH 9.5, contained phenylphosphate as above and 4.65 mg of MgCl₂. Homogenate concentration, time and temperature of incubation as in (a). The same homogenates were used for (a) and (b). In both instances incubation was terminated by the addition of 1 ml of 49 per cent trichloroacetic acid.

This study which has been in part supported by the U.S. Vitamin Corporation is now being extended to other enzyme systems and tumors¹.

P. J. FODOR, C. FUNK, and PH. TOMASHEVSKY

Department of Biochemistry, New York Medical College and Funk Foundation for Medical Research, New York, N.Y., December 22, 1954.

¹ C. FUNK, Bull. Funk Found. 1, 3 (1953).

Zusammenfassung

Flexner-Jobling-Karzinome, die spontan regressieren, weisen eine zwei- bis vierfache Steigerung ihrer katheptischen Aktivität auf. Dabei ist die saure Phosphatase nicht veränderlich; die alkalische Phosphatase hingegen sinkt in regressierenden Tumoren auf einen Bruchteil ihrer ursprünglichen Aktivität.

Enzymic Activities of Vi Strains of *Salmonella typhosa* and their W Variants

SHRIVASTAVA *et al.*¹ sought to correlate the enzymatic activities of various strains of *S. typhosa* with the presence of Vi antigen in these strains. These authors reported marked differences in the oxidative metabolism of glutamic acid and tyrosine and concluded that the Vi antigen is in some way responsible for the higher metabolic activities of Vi containing strains. The strains examined by SHRIVASTAVA *et al.* represented the recognized possible antigenic combinations known to occur in *S. typhosa*. Thus, the Vi I strain contained predominantly Vi antigen, the Watson V strain possessed all three antigens, Vi, O, and H, the H901 strain contained the H and O antigens, while the O901 strain possessed O antigen only. Although these strains cover all antigenic variations of *S. typhosa*, their known antecedents clearly indicate that they are separate isolates and aside from possession of common antigens, they are unrelated. Consequently, the possibility must be considered that the observed variations in oxidative metabolism may be due to enzymatic differences inherent in each strain. If this were the case, such differences would not be correlated with the presence of the Vi antigen. In order to determine whether such a causal relationship actually exists, a number of V strains of *S. typhosa* were compared with W variants (substrains) isolated directly from each of the strains. In one instance a V form substrain isolated from strain H901 following mouse passage was compared with its original non-Vi strain².

The strains examined in these experiments are given in the table. The cells were grown on meat extract agar plates for 18 h at 37°C, and were harvested, washed and resuspended in M/15 phosphate buffer. The suspensions were then adjusted to a final density of 500 as measured with the Klett-Summerson photoelectric colorimeter using the blue filter (420 mμ). Oxidative activities were followed manometrically at 37°C in the usual Warburg apparatus. Final volume in all vessels was 2.5 ml, which included 2.0 ml cells in the main compartment, 0.4 ml substrate in the side arm (either M/50 l-glutamic acid, M/50 tyrosine or 20% glucose), and 0.1 ml 20% KOH in center well.

The results of this comparison of activities on the substrates tested indicated identical uptake by V and W forms of the same strain. Thus, the data obtained for strain Ty2 V and Ty2 W when plotted as activity curves were found to be superimposed throughout the course of the experiment. Tests with the V and W forms of the Watson strain, the V and W forms of strain 58 as well as the V and W forms of strain H901 confirmed these results. The data clearly indicated that the V and W forms of each strain behaved in an identical manner

Oxidation of Glutamic Acid by V and W Substrains

<i>S. typhosa</i> Strain	μl O ₂	
	60 min	120 min
Ty2 V	164	347
Ty2 W	170	355
Watson V	104	214
Watson W	102	208
H901 V	130	264
H901 W	124	258
58 V	74	158
58 W	82	176

towards the substrates tested (glucose, tyrosine and glutamic acid). However, it will be seen that differences existed between the strains. These experiments demonstrate that the interstrain differences cannot be correlated with the presence or absence of the Vi antigen.

FELIX and PITT¹ have established the important role played by the Vi antigen in mouse virulence. The nutritional requirements of the culture as a major factor in mouse virulence have been clarified by BACON *et al.*², and FORMAL *et al.*³. Any attempt to correlate enzymatic activities of the various typhoid strains with antigenicity and virulence should take into account the individual differences of strains having different origins. Thus, any comparison of Vi and non-Vi containing strains for effects attributable to the Vi component is best accomplished by the use of W variants isolated from the same Vi strain. This is further borne out in a later paper by the authors themselves in their study of aryl sulphatase activity in *S. typhosa*⁴. The fact that only strain Vi I demonstrated any appreciable activity while other Vi strains tested were essentially inactive further serves to emphasize the desirability of including the W form of strain Vi I as a control⁵.

L. S. BARON

Department of Bacterial Immunology, Immunology Division, Army Medical Service Graduate School, Washington, D. C., February 26, 1955.

Zusammenfassung

Enzymatische Aktivitäten in V-Stämmen von *Salmonella typhosa* wurden mit solchen in W-Stämmen, welche aus V-Kulturen isoliert worden waren, verglichen. Die Aktivitäten in V- und W-Formen gleicher Stämme waren identisch und sind daher unabhängig vom Vorhandensein oder Fehlen des Vi-Antigens.

¹ G. C. SHRIVASTAVA, S. C. AGARWALA, and S. S. BHATANAGAR, *Exper.* 9, 421 (1953).
² L. S. BARON, unpublished data (1952).

¹ A. FELIX and R. M. PITT, *J. Hyg.* 49, 92 (1951).
² G. A. BACON, T. W. BURROWS, and M. YATES, *J. Exptl. Pathol.* 32, 85 (1951).
³ S. B. FORMAL, L. S. BARON, and W. SPILMAN, *J. Bacteriol.* 68, 117 (1954).
⁴ G. C. SHRIVASTAVA, K. L. ARORA, and S. S. BHATANAGAR, *Exper.* 10, 493 (1954).
⁵ G. P. GLADSTONE, *Br. J. Exptl. Path.* 18, 67 (1937). Growth of Vi strains in synthetic media where amino acids provide the sole carbon source results in rapid conversion to the non-Vi state. This provides a convenient means of obtaining W substrains.

Influence of Glucose on the Multiplication of Ornithosis Virus *in vitro*

The reproduction of rickettsiae was reported to take place in the host cells when the cell metabolism is rather low¹. Since viruses of Psittacosis-LGV group have similarities to rickettsiae, the experiments were set up to test the influence of glucose on the multiplication of ornithosis virus *in vitro* in comparison with *Rickettsia tsutsugamushi*.

Carrel or Erlenmeyer flasks of 4.5 cm diameter were used for tissue culture work. Virus suspension was always prepared from the mouse brain infected with the KAM strain² by using glucose-free Tyrode solution and inoculum for tissue culture contained about 10^4 LD 50 virus. To a series of culture flasks 2.7 ml of culture fluid, 0.1 ml of minced tissue and 0.3 ml of virus suspension were added. Each flask was sealed with a rubber stopper and put in 37°C incubator. The contents of each flask was taken out at varying times after virus inoculation and after light centrifugation, LD 50 of the supernatant (10^{-1}) was measured by intracerebral titration in the mouse as described before³.

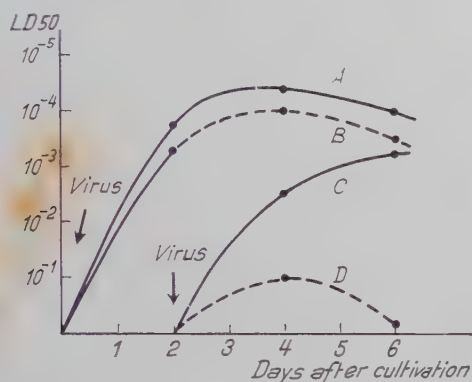


Fig. 1.—Multiplication of ornithosis virus in chick embryonic tissues *in vitro*.

When normal Tyrode solution with 100 mg/dl glucose was used as a culture medium, the propagation of the ornithosis virus obviously occurred and serial cultivation of the virus was successful either in embryo or yolk sac from a 9–11 day chick embryo. In the medium with 10 mg/dl glucose the virus gradually decreased and no propagation of the virus was observed in glucose-free medium. In the glucose-containing culture medium minus cells the ornithosis virus lost its infectivity within 24 h at 37°C. Various amino acids or folic acid could not substitute glucose to support virus multiplication. Attempts were also made to propagate *Rickettsia tsutsugamushi* in embryo or yolk sac in either glucose-containing or glucose-free fluid, but failed.

Influence of glucose on the later stage of virus cultivation was examined. Virus suspension was added to the two series of flasks (Fig. 1, A and B) at the beginning of tissue culture and on the second day of cultivation the culture medium of A flasks was substituted with Tyrode solution with 100 mg/dl glucose and in B the medium was substituted with glucose-free Tyrode solution. As shown in Figure 1, even when culture medium was substituted with glucose-free Tyrode solution, multiplication of the virus proceeded just as in glucose-containing medium. At the same time, the embryo was cultivated in culture

medium with 100 mg/dl glucose and on the second day, in one series of flasks (C) the medium was substituted with the solution with 100 mg/dl glucose and in another series of flasks the medium was substituted with glucose-free solution (D). To both series of flasks the virus suspension was added next. In this instance, the tissue permitted reproduction of the virus in glucose-containing medium but did not in glucose-free medium. Thus, the need for glucose as a source of energy for the growth of ornithosis virus is similar to that of influenza virus¹.

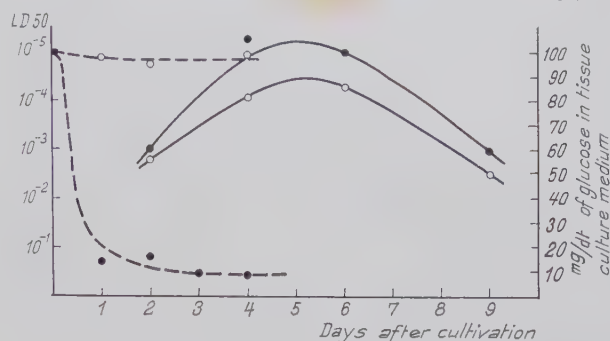


Fig. 2.—Multiplication of ornithosis virus and sugar consumption in chick embryonic tissues.

●—● virus titer
●---● amount of glucose } in embryo-cultured media.
○—○ virus titer
○---○ amount of glucose } in yolk sac-cultured media.

The ornithosis virus was cultivated using chick embryo and yolk sac in Tyrode solution with 100 mg/dl glucose and multiplication of the virus and sugar consumption by virus-infected tissues was measured successively in a series of culture flasks. The amount of glucose in culture fluid was determined by the method of SOMOGYI². In the virus-infected embryo most of the glucose was utilized 24 h after cultivation, namely, multiplication of the virus attained the maximum after complete sugar consumption. On the other hand, the virus propagated in the yolk sac as well as in the embryo, but no appreciable sugar consumption was observed in this instance. This result is in accord with the experiments reported by MOULDER *et al.*³ using different methods. It is conceivable that the yolk sac utilizes glucose as does the embryo, but other reducing substances derived from the yolk sac cause such results, as if there occurred no glucose utilization in the yolk sac. According to MOULDER *et al.*, the yolk sac has the ability to accumulate a high concentration of free glucose without being able to oxidize it. So far as we have determined, there were no significant differences in glucose utilization between normal and virus-infected tissues.

T. KUWATA⁴ and S. SHIBA

Department of Bacteriology, Chiba University School of Medicine, Chiba, Japan, March 27, 1955.

Zusammenfassung

Glukose ist unbedingte Voraussetzung zur Synthese von Ornithosis-Virus sowohl beim Embryo wie beim Dottersack *in vitro*. Nach erfolgter Infektion vermehrt sich das Virus auch ohne Glukose. Die beiden Glukosestoffwechsel unterscheiden sich deutlich.

¹ M. O. EATON, Arch. f. Virusforsch. 5, 53 (1952).

² M. SOMOGYI, J. Biol. Chem. 160, 19 (1945).

³ J. W. MOULDER, B. R. S. MCCORMACK, and M. K. ITATANI, J. Infect. Dis. 93, 140 (1953).

⁴ Present address: Department of Microbiology, Yale University School of Medicine New Haven, Connecticut, U.S.A.

¹ H. ZINSSER and E. B. SCHOENBACH, J. Exp. Med. 66, 207 (1937).

² T. KUWATA, Science 114, 640 (1951).

³ T. KUWATA, Naturwiss. 41, 43 (1954).

Some Observations on Pigments of the Pacific Sand Dollars, *Dendraster excentricus* and *Dendraster laevis*¹

Two of the commoner flat echinoid species of the Pacific coast are the purple sand dollar, *Dendraster excentricus*, and its light tan or buff-coloured, smooth-surfaced relative, *D. laevis*, which possesses fewer, shorter, slenderer spines and which inhabits deeper, colder water (CLARK²). The animals live on sandy floors, often burying or half-burying themselves therein. They are typical feeders on sandy detritus.

Collections of each species were made by the diving instructor, Mr. CONRAD LIMBAUGH, on July 20–21, 1954, *Dendraster excentricus* being taken from a depth of about 6 fathoms beneath the surface in the New Valley of Scripps Submarine Canyon, and *D. laevis* from depths of 8–11 fathoms, on the floor of the La Jolla Submarine Canyon.

In addition to the relatively minor morphological differences between the two species, the obvious differences in their colours and in their respective habitats, there is a striking biochemical contrast which led to this investigation. When preserved in dilute formaldehyde solution, each species readily yielded its own characteristic pigment, the purple animals conferring a deep port-wine purple, and the buff ones, a conspicuous green colour to the aqueous solution, while the whole external surfaces of the latter animals changed from light buff to deep green in colour. A similar discharge of pigment occurs in distilled water.

An earlier report briefly mentioned the presence of echinochrome in the ectoderm, endoderm, intestine, ovary, spermary and egg cases of *Dendraster excentricus* (FOX and SCHEER³). In the present study, two or more such fractions were recognized, and will be discussed below.

Dendraster laevis. This species often exhibits small green patches or scars when first collected. The effect may be replicated quickly by rubbing or scraping the animal's surface to rupture the ectoderm, which at once turns green, while the pigment is readily liberated into sea water. The whole internal organs yield the green pigment into distilled water, just as does the whole intact animal.

In the leaching of the pigment by distilled water, the prevailing pH (5) is not the controlling factor, since sea water adjusted to the same pH value leached no pigment even after an overnight period; the animals remained alive. The pH had risen, however, after a few hours, to 5.8.

Sea water containing 10% (v/v) of concentrated formaldehyde produces the colour change to green only very slowly, and without evident leaching.

The green pigment is not soluble in ether or in chloroform; it loses its colour at pH values below about 3 (dilute acetic acid), turns green at about pH 5; above pH 10.0 it is precipitated in murky green flocs. The maxima at pH 5 are at 395, 430, (510), and 620 m μ , and at pH 10, 395, 455 and 660 m μ (Fig. 1).

The addition of very small amounts of hydrosulphite produces no obvious effects; somewhat more of the salt causes a discharge of the colour, due to pH effects, since some of the colour may be restored, not by shaking in air but by neutralizing with bicarbonate.

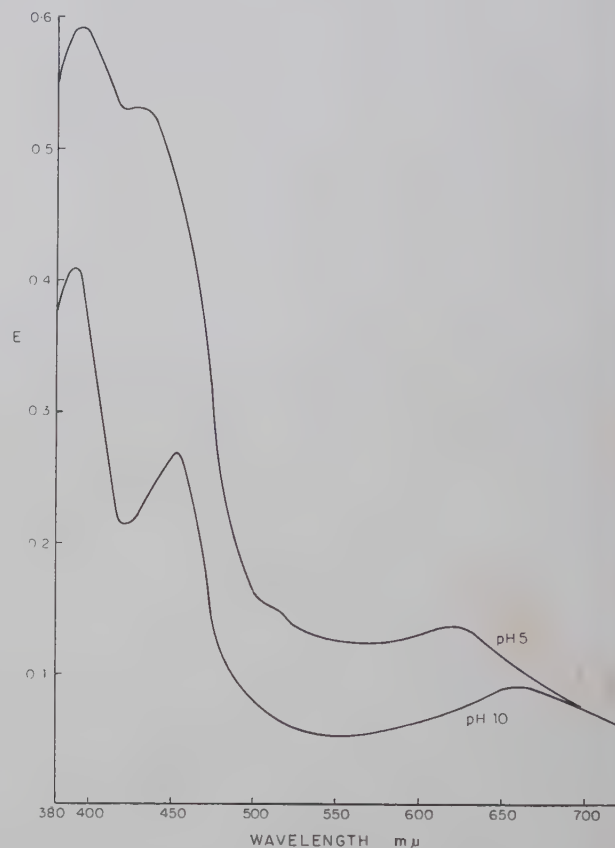


Fig. 1.—The absorption spectrum of the water-soluble pigments from *Dendraster laevis*. (A) at pH 5.0; (B) at pH 10.0.

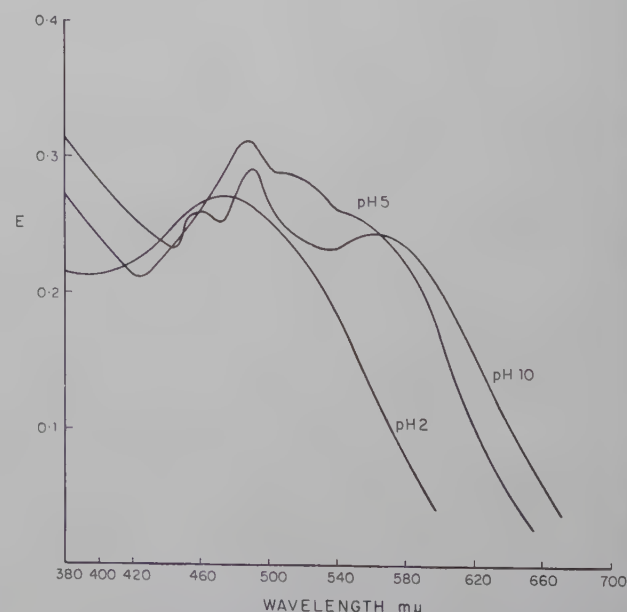


Fig. 2.—The absorption spectrum of the water-soluble pigments from *Dendraster excentricus*. (A) at pH 2; (B) at pH 5; (C) at pH 10.

¹ Contribution from the Scripps Institution of Oceanography, University of California, New Series No 773.

² H. L. CLARK, Allan Hancock Found. Publ., First Series Allan Hancock Pacific Expedition 8, 225 (1948).

³ D. L. FOX and B. T. SCHEER, Biol. Bull. Woods Hole 80, 441 (1941).

When the shell of *D. laevis* is treated with HCl and ethyl ether (GOODWIN and SRISUKH¹) no pigment passes into the ether as the skeleton dissolves, indicating the absence of any echinochrome-like naphthoquinone pigments.

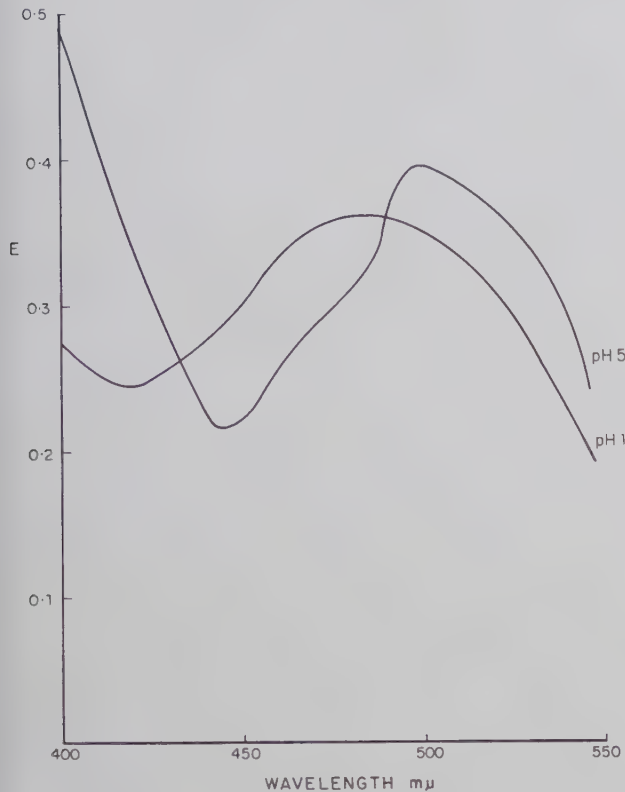


Fig. 3.—The absorption spectra of the least adsorbed pigment fraction from the water-soluble purple pigments of *Dendraster excentricus*. (i) at pH 1; (ii) at pH 5.

Dendraster excentricus. The water-soluble purple pigment of this species turns orange-red at pH 1 and is precipitated as a brownish mass at pH 10. Absorption maxima of aqueous systems at different pH values are shown in figure 2.

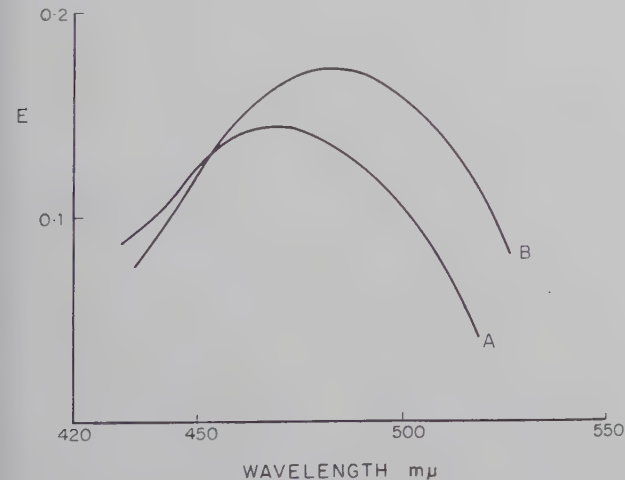


Fig. 4.—The absorption spectra in ether of the two main “echinochrome-like” pigments from *Dendraster excentricus*. (A) the less strongly adsorbed pigment; (B) the strongly adsorbed pigment.

¹ T. W. GOODWIN and S. SRISUKH, *Biochem. J.* **47**, 69 (1950).

The pigment passed uninterruptedly through a celite column, but was adsorbed by alumina, from which 10% HCl removed an orange-purple fraction (A) whilst a firmly bound purple component (B) remained at the top of the column.

The colour changes in fraction A, according to prevailing pH (Fig. 3), suggest that the firmly adsorbed purple fraction B, not yet isolated in pure form, may be mainly responsible for the prominent peak at 480 mμ, observed in the crude extracts (Fig. 2). These pigments are not extractable with ether, but are reversibly reducible with hydrosulphite, which suggests a quinonoid character.

Treating the shells of *D. excentricus* with HCl and ether yields an orange ethereal extract, indicating the presence of echinochrome-like pigments (cf. Fox and SCHEER¹). Chromatography on CaCO₃ yields two main fractions, although there are small traces of others as well. Fraction A, eluted with ether, exhibits a rather broad absorption maximum at 470 mμ; and B, eluted with ethanol, a maximum of similar shape at 485 mμ (Fig. 4). Both pigments are extractable from ethereal solution with soda, and both are reversibly reducible with hydrosulphite. They do not appear to be any of the quinonoid pigments already described by LEDERER².

Thus the two species of *Dendraster* are in contrast through their pigments, as summarized in the table. The state of the water-soluble pigments in the tissues has not yet been investigated. The green pigment of *D. laevis* is normally present in its colourless form.

A Comparison of the Pigments of *Dendraster excentricus* and *D. laevis*

Pigment	<i>D. laevis</i>	<i>D. excentricus</i>
Water-soluble	Green; colourless below pH 5.0	Two pigments, purple above pH 5.0, orange-purple below pH 5.0
Ether-soluble	absent	Two echinochrome-like pigments present

Nutritional or metabolic differences between the two species, as emphasized by these marked pigmentary contrasts, would be well worth detailed study.

T. W. GOODWIN and D. L. FOX

Department of Biochemistry, The University of Liverpool, England, and Division of Marine Biochemistry, Scripps Institution of Oceanography, University of California, La Jolla, California, March 27, 1955.

Zusammenfassung

Dendraster laevis bildet ein grünes, wasserlösliches Pigment (farblos bei pH unter 5) und kein Echinochrom. *Dendraster excentricus* dagegen erzeugt zwei purpurrote, wasserlösliche und zwei echinochromähnliche Pigmente.

¹ D. L. FOX and B. T. SCHEER, *Biol. Bull. Woods Hole* **80**, 441 (1941).

² E. LEDERER, *Biochem. Biophys. Acta* **9**, 92 (1952).

Chemotaxine und Kapillarpermeabilität

In einer früheren Mitteilung haben wir gezeigt, dass entgegen anderer Auffassung in Bakterienkulturfiltraten chemotaktische und kapillarpermeabilitätssteigernde Wirkungen unabhängig voneinander vorkommen können¹. Die von uns beschriebenen Polysaccharide mit hoher chemotaktischer Wirksamkeit² schienen dafür geeignet, diese Frage nochmals zu überprüfen. Es wurden eine Reihe von zum Teil hochgereinigten Polysacchariden vergleichend auf chemotaktische Wirksamkeit an Leukozyten *in vitro* und auf Erzeugung einer Trypanblauquaddel bei intrakutaner Injektion am Kaninchen nach MENKIN geprüft³. Die unterstehende Tabelle zeigt die erhaltenen Resultate.

Es ergibt sich aus ihnen, dass die am höchsten gereinigten Bakterien-Polysaccharide mit sehr ausgesprochener leukozytenemigrationsfördernder Wirkung in hohen Konzentrationen keine Quaddelreaktion auslösen. Das Fehlen eines solchen Effektes stimmt durchaus damit überein, dass in anderen Versuchen die gleichen Stoffe keinerlei hyperämisierende oder anderweitige lokale Reizwirkung an der Conjunctiva zeigen⁴.

Ebenso unwirksam ist ein Polysaccharid aus Placenta (SHEAR und PERRAULT).

Eine Glykoproteinfraktion aus Schwangerenarn ruft sowohl eine Wirkung an Leukozyten als auch eine solche an der Trypanblauquaddel hervor. Dass die Wirkungen auch hier nicht «einem Stoff oder einer wirksamen Struktur» zukommen, lässt sich dadurch zeigen, dass der leukozytenemigrationsfördernde Wirkungsanteil hitzestabil ist, während der permeabilitätsfördernde durch Erhitzen zerstört wird.

Tabelle

Präparat	Leukozytenemigration wirksame Konzentration	Trypanblauquaddel wirksame Konzentration
Polysaccharid aus <i>Serratia</i>		
Marcescens, SHEAR	10 ⁻⁸	O *
Polysaccharid aus <i>Proteus</i> , KAHNT	10 ⁻⁹	O
Polysaccharid aus Placenta, SHEAR und PERRAULT	10 ⁻⁶	O
Glycoprotein aus Schwangeren- urin, BENZ, unerhitzt	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵
1 h 100°C erhitzt	10 ⁻⁵	O
Gastric Mucoid, WILSON, unerhitzt	O	10 ⁻⁵
1 h 100°C erhitzt	O	10 ⁻⁵
Mucoprotein, GOTTSCHALK, unerhitzt	O	10 ⁻⁵
1 h 100° C erhitzt	O	10 ⁻⁵
Serummucoid, RIMINGTON . .	O	O
Bloodgroup Substance		
Low A, High H, SMITH . . .	O	O
Mucin aus Ovarialzysten, BENZ	O	O

* Geprüfte Höchstkonzentration 10⁻⁴.

¹ R. MEIER, *Helv. chim. Acta* 34, 134 (1941).

² R. MEIER und B. SCHÄR, *Exper.* 10, 376 (1954).

³ V. MENKIN "Newer Concepts of Inflammation" (Thomas, Springfield, Ill., USA, 1948).

⁴ R. MEIER, P. DESAULLES und B. SCHÄR, *Arch. exp. Path. Pharmacol.* 224, 104 (1955).

Von den auf Leukozyten unwirksamen Stoffen zeigen nur zwei Präparate eine durch Neoansergan nicht beeinflussbare permeabilitätsfördernde Wirkung, Gastric-mucin (WILSON) und GOTTSCHALKS Mucoprotein. Das wirksame «Prinzip» ist hitzebeständig. Verschiedene andere Mucoide zeigen keinerlei Wirkung.

Antagonistische Beeinflussung der permeabilitätsfördernden Wirkung durch an sich unwirksame Polysaccharide und Mucoproteine liess sich nicht auffinden. Die antagonistische Relation, die zum Beispiel bei der Leukocytenmigration und der Virushämagglutination für GOTTSCHALKS Mucoprotein und SHEARS Polysaccharid nach unseren früheren Befunden besteht¹, ist hier nicht vorhanden.

Es kann somit geschlossen werden, dass die chemotaktische und die kapillarpermeabilitätssteigernde Wirkung voneinander trennbare Wirkungseinheiten darstellen, die in einer chemischen Substanz nicht zwangsläufig gekoppelt sind. Damit soll nicht ausgeschlossen sein, dass ausnahmsweise beide dem gleichen Stoff zukommen können. Weiterhin ergibt sich, dass die chemotaktische Wirkung an Leukozyten mit grösster Wahrscheinlichkeit nicht mit einem «histaminartigen» Mechanismus in Zusammenhang steht. Die Analyse spezifischer Komponenten des Entzündungsvorganges hat diese Verhältnisse in exakter Weise zu berücksichtigen.

B. SCHÄR und R. MEIER

Wissenschaftliche Laboratorien der CIBA-Aktiengesellschaft, den 20. April 1955.

Summary

Bacterial polysaccharides, which exhibit an intense specific stimulating effect on the migration of leucocytes, provoke no trypan blue reaction on the intracutaneous vesicle. Certain mucoproteins show both effects, others only provoke the formation of vesicles. Both reactions are thus separable components of the phenomenon of inflammation.

¹ R. MEIER, B. SCHÄR und F. KRADOLFER, *Exper.* 11, 180 (1955).

Interaction of Serotonin and Lysergic Acid Diethylamide (LSD) in the Central Nervous System

It has been postulated that 5-hydroxytryptamine (serotonin, enteramine) plays an important role in the central nervous system in the maintenance of normal mental processes, and that a deficiency of serotonin or interference with its action may contribute to the production of mental disorders¹. This postulate is based in part on the observations that serotonin occurs in the brain, and that lysergic acid diethylamide (LSD), which produces profound mental disturbances in man resembling those of schizophrenia², is antagonistic to the effects of serotonin on various smooth muscles *in vitro*³.

In this communication we have described an antagonism by LSD of a central action of serotonin in the intact animal.

Serotonin was found to markedly potentiate the hypnotic action of hexobarbital in mice. This was

¹ D.W. WOOLLEY and E. SHAW, *Proc. Nat. Acad. Science* 40, 228 (1954).

² W. A. STOLL, *Schweiz. Arch. Neurol. Psychiat.* 68, 279 (1947)

³ J. H. GADDUM, *J. Physiol.* 121, 15 P (1953).

shown by experiments in which the sleeping times of mice pretreated with serotonin were compared with those of mice injected with hexobarbital alone. Table 1 shows that mice given 20 mg per kilogram of serotonin 10 min prior to 100 mg per kilogram of hexobarbital slept for a considerably greater time than did animals given only the barbiturate.

Serotonin by itself in a dose of 20 mg per kilogram produced a mild depression, but doses as high as 100 mg per kilogram failed to produce hypnosis.

When serotonin was administered intravenously to mice which had just recovered from hypnosis induced by hexobarbital, the animals almost immediately fell asleep again. This shows that serotonin causes subhypnotic amounts of the barbiturate to become hypnotic. Thus, it acts like chlorpromazine and reserpine by increasing the sensitivity of the central nervous system to the barbiturate¹, rather than like β -diethylaminoethyl diphenylpropylacetate (SKF 525-A) which potentiates the activity of many drugs by interfering with their rate of detoxication².

Duration of hypnosis of hexobarbital in mice. Adult male mice were given the various drugs intraperitoneally. LSD (10 mg per kilogram) was given one hour before, and serotonin (20 mg per kilogram) given 10 min before hexobarbital (100 mg per kilogram). The duration of hypnosis is defined as the time from the loss to the return of the righting reflex. Values for duration of hypnosis are means $\pm$ standard deviations. Figures in brackets refer to numbers of animals in each series.

Hexobarbital alone min	Hexobarbital + Serotonin min	Hexobarbital + LSD + Serotonin min
19 $\pm$ 6 (12)	61 $\pm$ 7 (8)	30 $\pm$ 5 (9)

When mice were given 10 mgm per kilogram of LSD prior to the serotonin, the potentiating effects of serotonin were markedly diminished (Table). LSD in doses of 5 mg per kilogram had an almost equivalent effect and definite antagonism to serotonin was observed with doses as low as 1 mg per kilogram. LSD by itself had little or no effect on the hypnosis produced by the barbiturate.

The observations described here are in accord with the concept that serotonin has an important function in the brain and that LSD produces its mental disturbances by suppression of some central action of serotonin.

P. A. SHORE, S. L. SILVER, and
B. B. BRODIE

Laboratory of Chemical Pharmacology, National Heart Institute, National Institutes of Health, Public Health Service, U. S. Department of Health, Education and Welfare, Bethesda, Md., March 10, 1955.

Zusammenfassung

Serotonin (5-Oxytryptamin) wirkt bei der Maus als mildes Sedativum und steigert den hypnotischen Effekt von Evipan deutlich. Diese Wirkungssteigerung kann durch Lysergsäure-diäthylamid (LSD) antagonisiert werden. Dieser Befund stimmt mit der Ansicht überein, dem Serotonin komme eine physiologische Rolle im Gehirn zu und dass LSD möglicherweise durch antagonistische Wirkung gegenüber Serotonin Psychose verursachen kann.

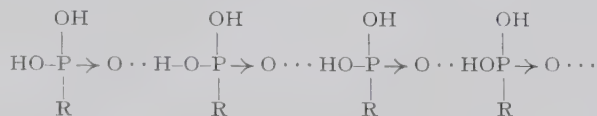
¹ B. B. BRODIE, P. A. SHORE, S. L. SILVER, and R. PULVER Nature (in press).

² J. AXELROD, J. REICHENTHAL, and B. B. BRODIE, J. Pharm. Exp. Therap. 112, 49 (1954).

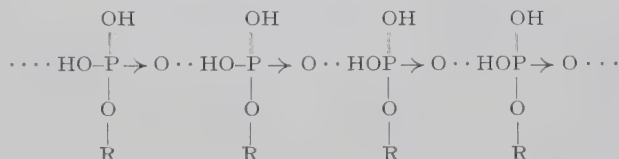
Zum Wirkungsmechanismus des Histamins

Wir haben in früheren Publikationen¹ dargelegt, dass Histamin die Kapillaraktivität von Cetyl-Phosphorsäure-ester an der Grenzfläche Chloroform-Wasser ausserordentlich stark erhöht. Histamin ist in dieser Hinsicht einzigartig, indem von einer grossen Anzahl bisher geprüfter organischer Verbindungen ähnlicher und verschiedener Konstitution keine dessen Wirkung auch nur annähernd erreicht. Fast ebenso stark, jedoch in entgegengesetztem Sinne, ist die Wirkung des Kalziums und des Bariums sowie der Antihistaminverbindungen. Im Hinblick auf die physiologische Bedeutung des Histamins haben wir einige Versuche unternommen, den Mechanismus dieses Phänomens aufzuklären.

Nach KOSOLAPOFF² sind Phosphonsäuren in ausgedehnter Masse assoziiert und bilden lineare Ketten von der Struktur:

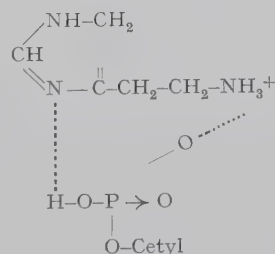


wobei der Zusammenhalt durch H-Brückenbildung zwischen den H-Atomen einer sauren Hydroxylgruppe und dem O-Atom der benachbarten Phosphonsäure bewirkt wird. Wir dürfen nun wohl annehmen, dass auch primäre Phosphorsäureester sich auf gleiche Weise durch H-Brücken assoziieren, so dass wir an der Grenzfläche Chloroformwasser einen Film mit der Struktur



haben, da ja bereits Cetylphosphat selbst eine Reduktion der Grenzflächenspannung bewirkt und demnach dieser Stoff an der Grenzfläche angereichert wird.

Diese laterale Adhäsion der Cetylphosphat-Moleküle ist nun in erster Linie massgebend für den Wert der Grenzflächenspannung, wie schon DANIELLI³ in seinen Untersuchungen mit langkettigen Carbonsäuren hervor gehoben hat. Einer Verminderung dieser lateralen Kräfte entspricht demnach eine Depression der Grenzflächenspannung. Wenn nun Histamin diese gegenseitige Adhäsion herabsetzt, so ist dies durch Bildung einer ringförmigen Anlagerung desselben an den Phosphorsäure-ester erklärbar, wobei durch Ionenbindung sowohl als durch Wasserstoffbrücken ein Komplex von der Struktur:



¹ R. HIRT *et al.*, Arzneimittelforschung 2; 453 (1952); 3, 175, 297 (1953); 4, 372 (1954).

² G. M. KOSOLAPOFF, J. Amer. chem. Soc. 74, 3427 (1952); J. chem. Soc. London 1950, 3535.

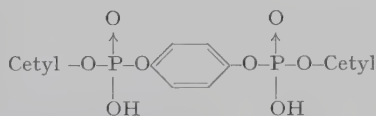
³ J. F. DANIELLI, Proc. Roy. Soc. London 122B, 155 (1937).

entsteht, zu dessen Bildung Histamin offenbar in besonderem Masse befähigt ist. Diese Spezifität ist bedingt durch die passende räumliche Anordnung und die geeigneten nukleophilen Eigenschaften der N-Atome in Histamin, das im primären Phosphorsäureester, dessen zwei Hydroxylgruppen stark verschiedene Dissoziationskonstanten haben, den geeigneten Partner findet. Am Briegleb-Kalottenmodell lässt sich diese günstige sterische Situation sehr gut erkennen. Zudem bewirkt das Histamin infolge seiner ausgeprägten hydrophilen Eigenschaften eine Fixierung des Komplexes an der Grenzfläche zum Unterschied zu den Antihistaminverbindungen, die bei ähnlichen nukleophilen Eigenschaften und sterischer Anordnung infolge ihrer höheren Alkylierung lipophile Komplexe ergeben, die nun in der lipoiden Phase «untertauchen», was sich an einer Verminderung der kapillaren Aktivität bemerkbar macht.

Der starke Anstieg der Grenzflächenspannung durch Kalzium- und Bariumionen wird, entsprechend der Annahme von DANIELLI¹, bewirkt durch die Verstärkung der lateralen Bindung durch elektrostatische Verknüpfung benachbarter Phosphorsäureester durch die zweiwertigen Kationen. Eine intramolekulare Ringbildung ist in diesem Falle, im Gegensatz zum Histamin, unwahrscheinlich, da ein Vierring entstehen müsste.

Auf einfache sekundäre Phosphorsäureester (Cetyl-Methylphosphat) ist Histamin völlig unwirksam, wie wir schon früher² mitgeteilt haben.

Es blieb noch die Möglichkeit einer Wirkung auf bissekundäre Phosphorsäureester, bei denen der Abstand der beiden sauren Hydroxylgruppen nach dem Kalottenmodell eine Ringbildung durch Histamin im erwähnten Sinne zulassen würde. Eine solche Verbindung ist der symmetrische Dicytylester des Hydrochinon-Diphosphats:



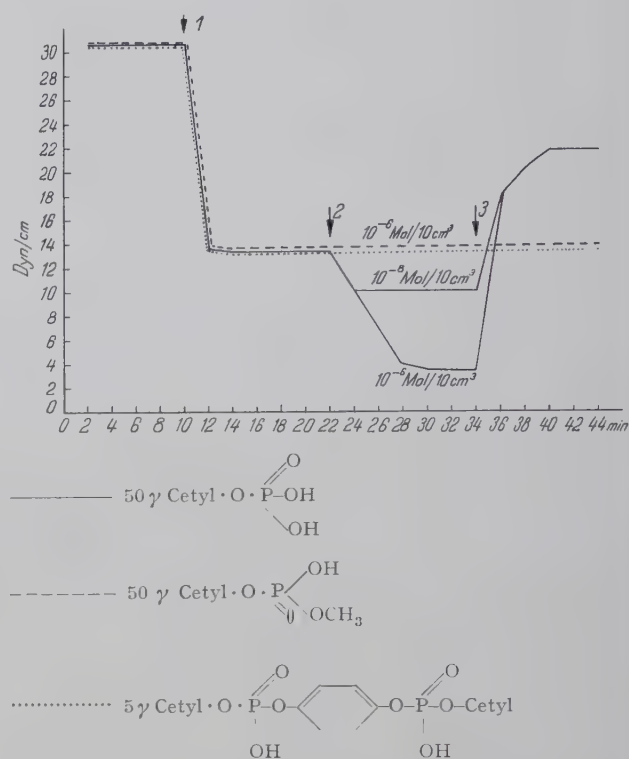
Es hat sich nun gezeigt, dass Histamin auf solche Verbindungen völlig wirkungslos ist, auch in Konzentrationen, die 100mal grösser sind als die Grenzverdünnung, die bei primärem Cetylphosphat noch eine deutliche Wirkung hervorruft. Über den Verlauf solcher Messungen orientiert die folgende graphische Darstellung von 3 Kurven, welche den angegebenen 3 Phosphorsäureestern entsprechen.

In diesem Kurvenbild sind auf der Ordinate die Werte der Grenzflächenspannung in Dyn/cm, gemessen mit dem Tensiometer nach LECOMTE DU NOUY und auf der Abszisse die Zeit in Minuten aufgetragen. Die untere Phase in der Messzelle besteht aus 10 cm³ reinstem Chloroform, die obere aus 10 cm³ destilliertem Wasser. Im übrigen verweisen wir auf unsere früheren Publikationen².

Bei Pfeil 1 erfolgt die Zugabe der angegebenen Menge Phosphorsäureester, gelöst in 0,1 cm³ Chloroform. Dadurch sinkt im Verlauf von rund 2 min die Grenzflächenspannung von 30 bis 13–14 Dyn/cm auf 13–14 Dyn.

Pfeil 2 bezeichnet den Moment der Zugabe der angegebenen Menge Histamin-Dichlorhydrat, gelöst in 0,1 cm³ Wasser. Wie ersichtlich, verursacht Histamin beim primären Phosphat schon bei einer Zugabe von 10⁻⁶ Mol zu den 10 cm³ Wasser eine starke sekundäre Depression

der Grenzflächenspannung, während bei den sekundären Phosphorsäureestern auch 10⁻⁶ Mol Histamin völlig wirkungslos sind.



Pfeil 3 bezeichnet den Moment der Zugabe von 10⁻⁶ Mol Ca-acetat in 0,1 cm³ Wasser gelöst. Dieses bewirkt beim primären Phosphat einen starken Anstieg der Grenzflächenspannung, wobei wiederum die sekundären Ester nicht beeinflusst werden. Dieser Effekt ist eine direkte Einwirkung auf das primäre Phosphat, wie wir schon früher¹ dargelegt haben, da er auch ohne Histamin eintritt und die Wirkung des Histamins überkompensiert. Eine ähnliche Wirkung wie Kalzium-Ionen haben höhere aliphatische Amine – als freie Basen oder als Chlorhydrate – und ganz speziell die Antihistaminverbindungen.

Die grosse Spezifität der Histaminwirkung an sich auf primäre Phosphorsäureester sowie die ausgesprochene antagonistische Wirkung des Kalziums und der Antihistaminverbindungen darauf rechtfertigen u. E. die Vermutung, dass auch der physiologische Wirkungsmechanismus des Histamins mit primären Phosphorsäureestern verknüpft ist. Steht an unserem Test der Einfluss des Histamins auf primäre Phosphorsäureester an Grenzflächen im Vordergrund, so geschieht dies in erster Linie aus methodischen Gründen. Die gleiche Wirkung des Histamins dürfte sich aber auch in homogenem Milieu abspielen und zu einer Desaggregation und Blockierung von primären Phosphorsäureestern, wie sie in Proteinen² und Fermenten³ vorkommen, führen.

R. HIRT und R. BERCHTOLD

Forschungsinstitut der Dr. A. Wander AG., Bern, den 16. April 1955.

¹ R. HIRT *et al.*, *Arzneimittelforschung* 2, 453 (1952); 3, 175, 297 (1953); 4, 372 (1954).

² G. PERLMANN, *Biochem. Biophys. acta* 13, 452 (1954); *J. Amer. chem. Soc.* 74, 3191 (1952); *Nature* 174, 273 (1954).

³ A. W. D. AVISON *et al.*, *Quart. Rev.* 5, 717 (1951).

¹ J. F. DANIELLI, *Proc. Roy. Soc. London* 122B, 155 (1937).

² R. HIRT *et al.*, *Arzneimittelforschung* 2, 453 (1952); 3, 175, 297 (1953); 4, 372 (1954).

Summary

With the aid of the tensiometer, it can be proved that histamine reacts in a specific manner with primary phosphoric acid esters. This proof is brought about by strongly increasing the capillary activity of cetyl phosphate by histamine on the interface chloroform water. The mechanism of this reaction is discussed. Simple secondary phosphoric acid esters and bi-secondary phosphoric acid esters are not influenced under the same conditions. A pronounced antagonistic effect of calcium ions antihistamine compounds may be proved with the same assays.

The point of attack of these compounds is the phosphate and not the histamine. The results of the tests confirm the assumption that the mode of action of the histamine and of the antihistamine compounds is connected with primary phosphoric acid esters.

Stability and Local Anaesthetic Effect in Some Derivatives of "Xylocaine"

Xylocaine (o,o'-dimethyl-N-diethylaminoacetyl-aniline), prepared by LÖFGREN in 1943, is one of the most successful recent local anaesthetics. In view of the favourable properties of this compound in clinical practice, a number of structural analogues has been prepared by various authors. From published work on the structure-activity relations in this series, particular interest attaches to the fact that the favourable properties of Xylocaine, and especially the duration of its action, are largely dependent on the presence of the two ortho-methyl substituents on the aromatic nucleus. This fact clearly emerges in the case of e.g. analogues derived from the isomeric xylidines and toluidines, and more strikingly still from a comparison with the demethylated analogues derived from o-toluidine and aniline. LÖFGREN¹, who was the first to note this effect, interpreted it in the light of the mechanism of action proposed by him, which was based on the inhibition of resonance between nitrogen atom and the aromatic nucleus. More recently HACH² has criticized LÖFGREN's theory and submitted the view that lipophilic character is an important factor affecting the activity of Xylocaine and its isomeric and demethylated analogues.

Though the chemical stability of Xylocaine was noted already by LÖFGREN and later confirmed particularly by WOOD *et al.*³, who studied the metabolism of this drug in dogs, this factor has, in our opinion, been given insufficient weight in theoretical considerations regarding the mechanism of action of this type of compound.

In consideration of the work of a number of earlier authors⁴ concerning the stability of anilide bonds in simpler compounds, we came to the conclusion that the increase in activity observed with progressive substitu-

tion of the ortho-positions with methyl groups might be connected with the increased stability of the amide linkage. Compounds of the Xylocaine type are most likely to be initially attacked *in vivo* at the anilide bond (peptidases) with formation of the free aromatic amine and liberation of the acid moiety. This assumption is borne out by the work of THER¹, which has recently become available to us, on the Xylocaine analogue Hostacaine. The stability of the anilide linkage must needs affect the metabolism of these compounds in the organism which leads to the formation of inactive metabolites from the active compounds (cf. e.g. KINDLER²).

Table I.—Structures and Numbering of the Compounds Studied

Structure R =			
	NHCOR	NHCOR	NHCOR
$-O\cdot CH_2\cdot CH_2\cdot N(C_2H_5)_2$ $-CH_2\cdot N(C_2H_5)_2 \dots$	"S 11" "S 200"	"S 31" "S 201"	"S 170" "S 202" (Xylocaine)

Table II.—Rate Constants of Acid Hydrolysis and Anaesthetic Activities

Compounds	Rate constant k (sec ⁻¹)	Activity	
		Surface anaesthesia (rabbit)	infiltration anaesthesia (guinea-pig)
"S 11"	8.22×10^{-6}	0.1	1.2
"S 31"	3.18×10^{-6}	0.54	1.0
"S 170"	3.32×10^{-7}	1.0	2.1
"S 200"	8.15×10^{-5}	(incomplete)*	0.12
"S 201"	2.64×10^{-5}	$(4.5 \pm 2.0 \text{ min})^*$	0.24
"S 202"	7.27×10^{-7}	0.24 $(52.5 \pm 2.0 \text{ min})^*$	1.4
Cocaine	—	1	—
Procaine	—	—	1

* Duration of complete anaesthesia after application of M/3 solution.

This hypothesis, which has been developed in more detail elsewhere³, has now been subjected to experimental testing by measurement of the rates of acid hydrolysis of Xylocaine ("S 202") and its demethylated analogues ("S 200" and "S 201") as well as of the three structurally related carbamates ("S 11", "S 31", and "S 170") and comparison with the local anaesthetic activities of these compounds. The structures of the substances studied are shown in Table I; the results are recorded in Table II.

The rates of hydrolysis were studied in 5N-HCl at 99.5°C at an initial substrate concentration of 0.01 M and followed by an electrophotometric determination of the

¹ N. LÖFGREN, Arkiv Kemi Mineral. Geol. [A] 22, No. 18, 1 (1946). — N. LÖFGREN and B. LUNDQUIST, Svensk Kem. Tid. 58, 206 (1946). — N. LÖFGREN, Xylocaine a new synthetic drug (Haeggströms, Stockholm 1948).
² V. HACH, Českoslov. farm. 2, 159 (1953).
³ F. G. McMAHON and L. A. WOODS, J. Pharmacol. Exptl. Therap. 103, 354 (1951); Federat. Proc. 10, 321 (1951).
⁴ G. SEMERANO, Gazz. chim. ital. 61, 921 (1931). — G. BADDELEY, Nature 144, 444 (1939). — O. CH. DAVIS, J. Chem. Soc. 1909, 1397; Z. physik. Chem. 78, 353 (1912). — O. CH. DAVIS and F. RIXON, J. Chem. Soc. 1915, 728. — P. FRIEDLÄNDER, Mn. Chem. 19, 642 (1898).

¹ L. THER, Arch. exptl. Path. Pharmacol. 220, 300 (1953). — L. THER and H. HARNISCH, Klin. Wschr. 31, 850 (1953). — A. HÄUSSLER and L. THER, Arzneimittel-Forsch. 3, 609 (1953).
² K. KINDLER, Arch. Pharm. 266, 19 (1928); 267, 541 (1929); Forschungen u. Fortschr. 10, 435 (1934).
³ A. SEKERA, New Trends in Local Anaesthetic Research lecture presented at the Scientific Conference, held at Brno University, February 19th–20th, 1954.

liberated aromatic amine. The anaesthetic activities in Table 2 are expressed as the ratios of the molar concentrations of the compound studied (as the hydrochloride) and the standard giving the same anaesthetic effect. Each compound was tested for both superficial anaesthetic activity (rabbit cornea; cocaine as standard in conc. $M/100$) and for infiltration anaesthesia (intra-dermal application to guinea-pigs; procaine as standard in conc. $M/50$) so that its effectiveness might be judged on a broader basis. In the case of compounds "S 200" and "S 201", the first of these methods could not be used because of their low activity; the duration of complete anaesthesia of the cornea after applications of $M/3$ solutions of these substances and of Xylocaine for comparison were therefore determined.

The results obtained so far show that both in compounds of the Xylocaine series and their carbamate analogues there is a distinct parallelism between the local anaesthetic effect and the resistance to hydrolysis with increasing *o*-methyl substitution. The only exceptions are the results with compounds "S 11" and "S 31" in infiltration anaesthesia; the difference between the two values (1.2 and 1.0), however, lies within the limit of error for the biological method of testing used.

Final conclusions as to the possible bearing of these results on the mechanism of action of the compounds studied must be postponed until the measurements of hydrolysis in alkaline solution and the determination of the activation energies and frequency factors now in progress have been completed. On the basis of these results it should then be possible to decide whether the effect noted is of steric or electronic origin.

We should like cordially to thank Dr. J. RUDINGER for the translation of this paper, which he has kindly made for us.

A. SEKERA, J. SOVA, and Č. VRBA

Department of Pharmaceutical Chemistry, Masaryk University, and Department of Pharmacology, School of Veterinary Medicine, Brno, Czechoslovakia, January 28, 1955.

Zusammenfassung

Die Reaktionsgeschwindigkeit der sauren Hydrolyse von Xylokain, Diethylaminoacet-*o*-toluidid und Diethylaminoacetanilid und seiner Carbat-Analoga wurde studiert: Die Stabilität dieser Verbindungen steigt mit fortschreitender Methyl-*o*-Substitution und verläuft mit ihren lokalanästhetischen Wirkungen parallel.

Spontaneous Peristaltic Activity in Arteries and Veins of Adult Goldfinches and Albino Mice Cultivated *in vitro*

In previous studies, the occurrence of a spontaneous peristaltic activity was shown in embryonic arteries of chick (ATTARDI, GANDINI, and MARCON¹; TONI²) and rabbit (ATTARDI³) and in veins of chick embryos and newly hatched chickens explanted *in vitro* (ATTARDI and ATTARDI GANDINI⁴).

¹ G. ATTARDI, E. GANDINI, and L. MARCON, Boll. Soc. ital. Biol. sper. 24, 1333 (1948).

² G. TONI, Boll. Soc. ital. Biol. sper. 29, 6 (1953).

³ G. ATTARDI, Boll. Soc. ital. Biol. sper. 25, 1057 (1949).

⁴ G. ATTARDI and D. ATTARDI GANDINI, Exper. 11, 37 (1955).

In this paper, evidence is presented that a similar contractile activity also occurs in arteries and veins of adult animals. For such investigations, animals of a small size, namely goldfinches (*Carduelis carduelis*) and albino mice (*Mus musculus*), were used, under the assumption that their vessels, owing to the small calibre and the thinness of the walls, should be in a suitable nutritive and mechanical condition for displaying a contractile activity in the plasmatic medium, into which they are explanted, as is the case with the embryonic vessels.

The isolated vessels were washed in physiological salt solution containing penicillin (50 units per cm³). Usually segments of vessel of 2 to 3 mm in length were explanted. The technique used was the same as described in the earlier reports; the culture medium was composed of chick plasma and ten day old chick embryo extract in equal parts.

The results of the experiments are shown in the Table.

In the adult goldfinch, all arteries tested, both central and peripheral, showed a contractile activity *in vitro*. The fact should be noted that this activity occurred in a very high percentage of explants (about 100%), in contrast to what was found in the case of embryonic arteries. Of the veins examined, a contractile activity was exhibited by those of the portal system and by the umbilical vein, a fact which had already been described in chick embryos and newly hatched chickens; moreover by some veins of the posterior portion of the body (coccygomesenteric vein, hypogastric vein, renal portal vein, femoral vein, external iliac vein, common iliac vein (anastomosis)¹: in the latter veins a spontaneous contractility of a peristaltic type had also been observed in chick embryos in the last period of incubation and in newly hatched chickens (personal data not yet published).

The valve shaped as a perforated diaphragm which is situated where the common iliac vein empties into the efferent renal vein (SPANNER²) shows *in vitro* a rhythmic contractile activity, which is at present the object of a more detailed study.

In the arteries, the contractile activity is in most cases noticeably powerful and appears as typically coordinated. The contraction manifests itself as a contractile wave which almost always starts from one extremity of the explanted segment and propagates along the latter at a varying speed in the different explants, and is followed by a relaxation which likewise takes place successively in the following portions of the vessel. It is therefore justifiable to describe these contractions as of the peristaltic type, bearing in mind, of course, that their more or less typical character may be influenced by the particular conditions under which the explanted vessels are placed, on account of their isolation from the organism and of the lack of any internal pressure to keep their walls extended. The contractile activity starts immediately after explantation, or at least within the first hour, and generally becomes exhausted within 6-12 h; in several cases, however, persisting for longer periods, up to 2-3 days, although much weakened. The frequency of the contractions is generally higher in the more peripheral arteries. In the veins the contractile activity, which is likewise of a peristaltic type and fairly powerful, generally begins within the first hour and lasts from a few hours to 2 or 3 days.

¹ For the above indicated veins the terminology proposed by R. SPANNER, Morph. Jb. 54, 560 (1925), has been used.

² R. SPANNER, Morph. Jb. 54, 560 (1925).

Goldfinch		Albino mouse	
Vessel	Frequency of the contractions at 38,5° C (min. and max. values)	Vessel	Frequency of the contractions at 38,5° C (min. and max. values)
Common carotid artery	5-13	Brachial artery	4-11
Brachial artery	24-42	Median artery	13-28
Interosseous artery of the wing	24-29	Intercostal artery	14-65
Superficial ulnar artery	28-66	Hepatic artery	6-13
Thoracic aorta	5	Left gastric artery	4
Abdominal aorta	15-27	Lienal artery	4-25
Coeliac artery	16-49	Superior mesenteric artery	3-24
Right hepatic artery	14-90	Internal spermatic artery	4-19
Left hepatic artery	26-103	Renal artery	18-32
Superior mesenteric artery	14	Inferior mesenteric artery	4-17
Superior renal artery	25	External iliac artery	5- 7
Femoral artery	18-53	Femoral artery	4-27
Internal pelvic artery	11-35	Saphenous artery	5-11
Sciatic artery	20	Anterior tibial artery	8-17
Anterior tibial artery	13-45	Caudal artery	8-18
Common pudendal artery	10		
Middle coccygeal artery	11-14		
Right portal vein	19-67	Portal vein	48-72
Common mesenteric vein	59	Lienal vein	20-24
Left portal vein	3-16	Internal spermatic vein	6-23
Umbilical vein	8-14		
Coccygomesenteric vein	7-25		
Hypogastric vein	9-13		
Renal portal vein	2-12		
External iliac vein	6-22		
Femoral vein	17-31		
Common iliac vein ("Anastomosis")	6-23		

In the adult mouse, the central and peripheral arteries have also exhibited *in vitro* a rhythmical contractile activity; here too, in a high percentage of explants (about 60%). In some cases the contractions are very powerful and clearly peristaltic, in other cases only by middle power observation can the rhythmical oscillations of the walls be seen. The contractions start within the first hour of incubation and last for 1 or 2 h, more often however for longer, up to 2-3 days; in other cases, the contractile activity manifests or reaches its maximum only on the 2nd or 3rd day.

Of the veins of the adult mouse tested, a rhythmical contractile activity was observed in the portal, lienal and internal spermatic veins. In the portal vein, the activity is strikingly powerful and with a very high frequency of the contractions. It can often be noticed before transferring the fragment to the plasma, while it is still in the salt solution under the dissecting microscope. The contractions, which are of a peristaltic type, last *in vitro* for a long time (up to more than 15 days without washing or renewal of the culture medium), decreasing gradually in frequency but conserving a considerable energy. In the lienal and internal spermatic veins, the rhythmical activity observed was generally slight: it started immediately after the explantation and lasted only for a very short time (from a few minutes to half an hour), probably in connection with the occurrence of a progressive and quick retraction of their walls, which could be recognized from the narrowing of the lumen. Such a rapid and considerable retraction of the walls was noticed in a great part of the other veins tested, and the negative findings obtained on such vessels may perhaps be due precisely to this fact, rather than to the absence of a spontaneous contractility.

The results reported above provide the first direct evidence, since the discovery of the pulsatile veins of the bat wings (WHARTON JONES¹, HESS², MISLIN³), of the occurrence of a rhythmical peristaltic activity in the arteries and veins of adult birds and mammals: on account of the high intensity and frequency of the contractions, which are possibly still higher *in vivo*, it seems a reasonable supposition that this rhythmical activity plays a significant role in the mechanism of the circulation.

Further work on this subject is now in progress.

G. ATTARDI

Institute of Histology and General Embryology, University of Padua, January 22, 1955.

Résumé

L'auteur a mis en évidence une activité contractile spontanée et rythmique de type péristaltique dans les artères centrales et périphériques et dans quelques veines du système porte et de la moitié postérieure du corps, cultivées «in vitro». Les observations ont été faites sur un Oiseau (*Carduelis carduelis*) et un Mammifère (*Mus musculus*).

¹ T. WHARTON JONES, Philos. trans. roy. Soc. London, 1852.
² W. R. HESS, Pflügers Arch. 173, 243 (1919).
³ H. MISLIN, Helv. physiol. Acta [C] 5, 3-4 (1947).

Antimyocardial Antibodies in Rheumatic Fever

Hypothesis of autoimmunizing pathogenesis of rheumatism was submitted for the first time by ROBINSON¹ on the ground of pathological alterations obtained by immunizing rabbits with homologous seral protein mixed with streptococcus antigens. In 1945 CAVELTI² found antibodies against myocardial tissue in the serum of rheumatics; in 1947³ he demonstrated genesis of auto-antibodies in rats immunized by homologous antigen with streptococcus antigens. REJHOLEC, VANČURA, and WAGNER⁴, found auto-antibodies against myocardium in a certain percentage of sera of patients in acute stage of nephritis, and REJHOLEC and WAGNER⁵, discovered them regularly in the sera of rheumatics in the active stage of the disease. In patients in the active stage of glomerulonephritis, antirenal auto-antibodies were ascertained also by LANGE and collaborators in 1949⁶.

The present study aims at testing the occurrence of auto-antibodies in patients with diseases in which an immunotoxical (auto-immunizing) mechanism in the pathogenesis may be presumed.

Material and method. Preparation of sera: The sera of patients were regularly examined on the day of drawing. Early treatment is of importance for the results. The titres of auto-antibodies weaken in the course of few days.

Antigens: Human kidneys, myocardium and liver taken out at autopsy of persons killed in accidents, only a few hours after death, were, after crushing, extracted with 1.1 % NaCl in relation of 1:5. The crushed tissue was eliminated by centrifuging and the supernatant diluted 1:80. Diluted extract was used for sensibilisation of collodion particles.

Preparation of collodion: Collodion (Explosia E 22) particles for agglutinating reaction were treated by the Cavelti method. Ready particles were conserved in the dark and never used for longer than three weeks.

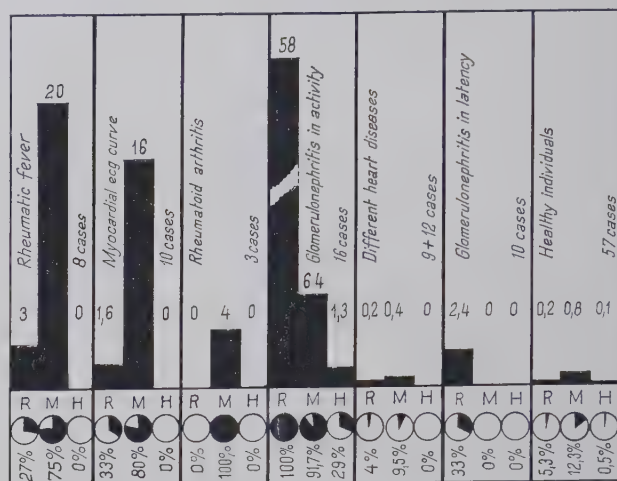
Sensibilization of collodion: Extracts of human organs diluted 1:80 are added to the collodion particles diluted with 1.1 % NaCl approximately to the density No. 2 of the MacFarland scale. Incubation time 1 h at chamber temperature.

The test: The treated serum is diluted in geometric progression from 1:4 to 1:256 and 0.5 ml of sensibilized collodion is added into each test-tube containing 0.5 ml of the diluted serum. After shaking, it was incubated for 1 h at chamber temperature. Short centrifuging: speed 1500 rev./min, duration 3 min.

Results are read after mild shaking with the aid of agglutinoscope. Positive results are characterized by larger or smaller granules, easily discernible from homogeneous turbidity of the negative reaction and of the controls. Controls were always made with insensitized collodion and with sera known as negative and positive.

Results. 8 cases of rheumatic fever, 10 cases of acute tonsillitis showing the so-called myocardial ecg curve, 3 cases of rheumatoid arthritis and 16 cases of active diffuse glomerulonephritis were examined for the presence of organo-antibodies, and the results were compared with findings in several control groups. The control groups consisted of 9 cases of myocardial infarction,

Average titres and occurrence of antirenal (R), antimyocardial (M), and antihepatic (H) auto-antibodies in rheumatic fever and other diseases in %.



12 cases of inactive valvular diseases, 10 cases of latent chronic glomerulonephritis, and 57 healthy individuals.

Antimyocardial antibodies were found in 75 % of the rheumatic fever cases without salicylate treatment with an average titre of 1:20. In 80 % of the acute tonsillitis cases showing the myocardial ecg curve, the average titre was 1:16, and in 100 % of the rheumatic arthritis cases 1:4. Antirenal antibodies were ascertained only in 33 % of all these groups with an average titre of 1:1.5. In 100 % of cases of active diffuse glomerulonephritis, the titres were markedly high (average 1:58, maximum 1:128), whilst in the period of latency of the same disease the antirenal antibodies were found in 33 % of cases only and showed very low titres (average 1:2.4, maximum 1:8). Antimyocardial antibodies were found in 91.7 % of glomerulonephritis cases in active stage, but their average titre was low (1:6.4). No antimyocardial antibodies were found in the stage of latency.

These results are in sharp contrast with those found in the control groups, where the occurrence of antimyocardial antibodies never exceeded 12.3 % with the maximum titre of 1:8. Antirenal antibodies were found there in 5.3 % of cases, the maximum titre being 1:8. Antihepatic antibodies did not reach any notable value in any of the control groups.

Discussion. The occurrence of antimyocardial antibodies in rheumatic fever and several other diseases is therefore strikingly high, in glomerulonephritis rather frequent. This fact seems to support the view that the presence of these antibodies has a similar connection with the immunotoxical pathogenesis of these diseases as has already been demonstrated in glomerulonephritis by the presence of antirenal antibodies. Since the beginning of the salicylate treatment, the antibodies recede or disappear.

V. REJHOLEC and V. WAGNER

Research Institute of Rheumatic Diseases, Prague, and Charles University, Institute of Microbiology, Pilzen, December 28, 1954.

Zusammenfassung

Kollodiumpartikel wurden mit Extrakten aus menschlichen Organen, wie Leber, Nieren und Myocard, sensibilisiert und damit Sera von Personen getestet, die an Krankheiten mit autoimmunisierenden Vorgängen in der Pathogenese litten. Die Ergebnisse dieser Versuche wurden mit denjenigen von Kontrollsera verglichen.

¹ J. J. ROBINSON, Arch. Pediatr. 61, 6 (1944).

² P. A. CAVELTI, Proc. soc. exp. biol. 60, 379 (1945).

³ P. A. CAVELTI, Arch. Pathol. 44, 1, 27 (1947).

⁴ V. REJHOLEC, A. VANČURA, V. WAGNER, and Z. MANDLÍKOVÁ, Sbor. lék. (Praha) 54, 195 (1952).

⁵ V. REJHOLEC and V. WAGNER, Sbor. lék. (Praha) 54, 217 (1952).

⁶ K. LANGE, A. GOLD, D. WIENER, and V. SIMON, J. Clin. Invest. 28, 1 (1949).

Disposition of Intra-Articularly Injected Hydrocortisone Acetate, Hydrocortisone Free Alcohol and Cortisone Acetate in Arthritis¹

Intra-articular injection of hydrocortisone acetate has been demonstrated by HOLLANDER, BROWN, JESSAR, and BROWN² to produce prompt alleviation of pains, and diminution of synovial swelling and effusion, with a fall to more normal intra-articular temperature in nearly 90% of patients with rheumatoid arthritis. In contrast to this, cortisone acetate in similar or even larger doses is far less effective, with only about 25% of the patients showing even partial improvement after intra-articular injection.

The reason for this difference in local anti-inflammatory action is obscure. Original assumptions that the difference was purely due to lower solubility of hydrocortisone acetate have proved inadequate.

The purpose of this report is to present the data on concentrations of hormone in the synovial fluid, its cells and the synovium at various intervals after intra-articular injection, i.e. the "disappearance rate", the relative distribution of the steroids in synovial cells and fluid, and the rate of hydrolysis of the acetate esters of cortisone and hydrocortisone.

The concentration of 17-hydroxycorticoids in the joint fluid and cells was measured by a modification of the methods of PORTER and SILBER³ and of NELSON and SAMUELS⁴ for blood. The cells were separated from the fluid by centrifuging the joint fluid and washing the centrifugate with physiological saline. The cells were then exposed to ultra sound for 15 min to break them up. After extraction, the amounts of 17-hydroxycorticoids were then determined for the cells, supernatant, and washings. The accuracy of the method was examined in 17 paired observations obtained within 75 min of injection. The average deviation of the observations from the mean of each pair was 4.3% with a maximum deviation of 14%. This degree of accuracy is believed to be due to the relatively high concentrations in the joint fluid during the first two hours after injection.

The relative proportion of the free form and the acetate present in the fluid and in the cells was determined by chromatographing appropriate aliquots of extract by a modification of the method of BURTON, ZAFFARONI, and KEUTMANN⁵. Approximations of quantities on the chromatogram were made by the method of TENNENT, WHITLA, and FLOREY⁶.

We have now injected a total of 23 different patients; studying one patient with four paired experiments, and another with three paired experiments. Patients with bilateral arthritis of the knee joints were injected intra-articularly with approximately isomolecular amounts of cortisone acetate (*E*), hydrocortisone acetate (*F*), or free hydrocortisone. Patients with unilateral knee joint arthritis were given unilateral injections of either of these substances. The concentrations of 17-hydroxy-

corticoids were measured at various intervals after injection (less than 180 min). The initial specimens were obtained within approximately 3 min after injection.

Results

Change in concentration of 17-hydroxycorticoids in total joint fluid after intra-articular injection.—It has been noted that the rate of change in concentration was approximately the same over the period charted for the three compounds and that the rate of change in concentrations seemed to be more closely associated with physiological differences in the subject rather than with the chemical characteristics of the compounds.

Measurements were also made at 24, 48, and 168 h after intra-articular injection in some experiments. Low concentration of Porter-Silber reacting material was found 24 to 168 h after intra-articular injection. In general, *F* acetate injections resulted in higher concentrations than *E* acetate. Most of the Porter-Silber reacting material present after *F* acetate injection was in the cells, while most of the material found after *E* acetate injection was in the fluid phase. The accuracy, however, of these low values is questionable.

Distribution of 17-hydroxycorticoids in cells and fluid. It has been noted, considering the concentration of 17-hydroxycorticoids contained in the cells expressed as a percentage of the concentration in the uncentrifuged joint fluid, that a considerably greater proportion of 17-hydroxycorticoids was found in the cells after injection of *F* acetate than after injection of *E* acetate, and *F* free alcohol. It has also been noted that there was a sharp decrease with time of the proportion found in the cells after *E* acetate and *F* free alcohol.

Proportion of 17-hydroxycorticoids present as the acetate in cells and fluid.—The proportions of non-hydrolyzed *F* acetate and *E* acetate in the fluid decreased relatively rapidly over the first 75 min while the proportion of the material present in the cells as the non-hydrolyzed acetate remained high.

The following conclusions were suggested on the basis of our data: (1) the rate of decrease in concentration for *E* and *F* acetates and *F* free alcohol was approximately the same in any one individual; (2) the hydrolyzed form of both of the acetates was present in greater proportion in the fluid than in the cells; (3) the proportion of 17-hydroxycorticoids present in the cells after injection of *F* acetate was greater than after the injection of *E* acetate and *F* free alcohol.

Proportion of 17-hydroxycorticoids present in the lining cells of the synovial membrane – Preliminary results.

We also injected 25 mg of cortisone acetate or hydrocortisone acetate into 5 arthritic knee joints at various intervals prior to synovectomy. At operation, the excised synovial tissue was immediately transferred to the endocrine laboratory, washed, and the inner layer dissected free. The lining layer of synovial tissue was then exposed to ultra sound and extracted for steroid analysis both by the Porter-Silber reaction and by paper chromatography. Our preliminary results showed that a large proportion of the intra-articularly injected *F* acetate was taken up and apparently stored by the lining cells of the synovial membrane at least for some days, whereas *E* acetate was absorbed in less than half the amount and disappeared much more quickly from the synovial lining.

We think these differences provide a clue to the reason for the greater local effectiveness of hydrocortisone in the arthritic joint. Further studies are in progress.

¹ Supported by a grant from the Helen Augusta Parkhill Foundation. — Communication at the 8th International Congress of Rheumatic Diseases, Geneva, August 1953.

² J. L. HOLLANDER, E. M. BROWN, JR., R. A. JESSAR, and C. Y. BROWN, *J. Amer. Med. Ass.* **147**, 1 (1951).

³ C. C. PORTER and R. H. SILBER, *J. Biol. Chem.* **185**, 201 (1950).

⁴ D. H. NELSON and L. T. SAMUELS, *J. Clin. Endocrin.* **12**, 519 (1952).

⁵ R. B. BURTON, A. ZAFFARONI and E. H. KEUTMANN, *J. Biol. Chem.* **188**, 763 (1951).

⁶ D. M. TENNENT, J. B. WHITLA, and K. FLOREY, *Analyt. Chem.* **23**, 1748 (1951).

We express our gratitude to Miss HELEN BULASCHENKO for technical assistance.

M. ZACCO¹, E. M. RICHARDSON,
J. O. CRITTENDEN, F. C. DOHAN,
and J. L. HOLLANDER

Arthritis Section Department of Medicine and Endocrine Section of the Pepper Laboratory of Clinical Medicine, University Hospital of Pennsylvania, Philadelphia, March 19, 1955.

Riassunto

In pazienti affetti da artrite reumatoide viene iniettato cortisone acetato, idrocortisone acetato, o idrocortisone, nel cavo sinoviale artritico.

La durata del riassorbimento di questi 17-idrossi-corticoidi; la loro distribuzione nelle cellule e nel fluido articolare e nelle cellule del rivestimento sinoviale; le andamento del processo idrolitico dei composti acetati, studiati con mezzi chimici e cromatografici, si prestano a commenti utili ad interpretare la maggiore efficacia locale dell'idrocortisone.

¹ Post-Doctorate Research Fellow, United States Public Health Service. (Permanent address: Istituto di Clinica Medica, University of Bari, Italy.)

Flavines in Experimental Diabetes

It is known that in diabetes (alloxan diabetes in animals, and spontaneous diabetes mellitus in man), a decrease of cocarboxylase content of tissue¹ occurs, due to a disturbance of thiamine phosphorylation².

No study has so far been undertaken to provide information about the behaviour of some of the other coenzymes in diabetic conditions, probably owing to the difficulty of carrying out their routine determination in the tissue.

¹ D. SILIPRANDI and N. SILIPRANDI, *Nature* 168, 422 (1951).

² D. SILIPRANDI and N. SILIPRANDI, *Nature* 169, 329 (1952). – N. SILIPRANDI and F. NAVAZIO, *Acta Med. Scand.* 142, 147 (1952).

Using the very handy method recently developed by BESSEY *et al.*¹ for the determination of riboflavine and its coenzymes in tissues, we have investigated the behaviour of these cofactors in alloxan diabetes and comparatively in normal rats. In a number of experiments, FAD has also been determined enzymatically according to the method of WARBURG and CHRISTIAN.²

The results reported in the table show that in diabetic liver a significant decrease of FAD and a corresponding increase of the fraction "FMN + Rib" occurs. In animals with diabetic coma both total flavines and FAD values strongly decrease in respect to normal animals, while the fraction "FMN + Rib" increases.

The administration of riboflavine does not appreciably change the FAD content, either in normal or in diabetic animals; only "FMN + Rib" fraction is augmented. When riboflavine is injected together with ATP, FAD increases significantly mostly in diabetic livers. An analogous effect is noticeable after administration of FMN and of FMN + ATP.

The low content of FAD of diabetic animals is therefore restored to normal values when riboflavine + ATP or FMN are administered. The occurrence in biological materials of the two following reactions:



discovered by KEARNEY *et al.*³ and by KORNBERG *et al.*⁴ respectively in yeast and in liver extracts, indicates that ATP is essential for the synthesis both of FMN and FAD.

In our experiments, the administration of riboflavine to the diabetic animals is as effective as FMN in restoring FAD to the normal values, provided that ATP is also injected. This is evidence that ATP, as indicated by these two reactions, is necessary for the synthesis of FAD *in vivo*, and that most probably both these reactions take place in the living organism.

Since ATP has been found deficient in diabetic liver⁵, the diminution of FAD observed in diabetic animals, may be attributed to this deficiency.

¹ O. A. BESSEY, O. H. LOWRY, and R. H. LOVE, *J. Biol. Chem.* 180, 755 (1949).

² O. WARBURG and W. CHRISTIAN, *Bioch. Z.* 296, 294 (1938).

³ E. B. KEARNEY and S. ENGLAND, *J. Biol. Chem.* 193, 821 (1951).

⁴ A. KORNBERG and W. E. PRICER, *J. Biol. Chem.* 182, 763 (1950). – A. W. SCHRECKER and A. KORNBERG, *J. Biol. Chem.* 182, 795 (1950).

⁵ N. O. KAPLAN and D. M. GREENBERG, *J. Biol. Chem.* 156, 525 (1944). – E. CUTOLO and N. SILIPRANDI, *Exper.* 8, 24 (1952).

Flavines $\mu\text{g/g}$ of fresh liver tissue

Treatment or condition	Normal rats				Diabetic rats			
	N° of experiments	Total flavines	FAD	FMN + Rib.	N° of experiments	Total flavines	FAD	FMN + Rib.
	18	33.93 $\pm$ 4.11	29.33 $\pm$ 3.41 (27.75 $\pm$ 3.05)	4.60 $\pm$ 0.51	19	27.87 $\pm$ 3.01	21.40 $\pm$ 3.01 (19.80 $\pm$ 2.60)	6.47 $\pm$ 0.7
Rib.(1)	11	39.22 $\pm$ 4.80	31.75 $\pm$ 3.60	4.47 $\pm$ 1.90	(⁰) 8	19.83 $\pm$ 2.04	11.50 $\pm$ 1.51 (11.10 $\pm$ 1.30)	8.33 $\pm$ 1.10
Rib. + ATP(2)	12	39.95 $\pm$ 4.20	32.45 $\pm$ 3.45	7.50 $\pm$ 1.65	10	31.47 $\pm$ 3.50	20.92 $\pm$ 2.70	10.55 $\pm$ 1.40
FMN(3)	15	38.02 $\pm$ 3.75	33.74 $\pm$ 3.65	4.28 $\pm$ 1.15	9	34.45 $\pm$ 3.70	27.40 $\pm$ 3.10	7.05 $\pm$ 1.10
FMN+ATP(4)	10	39.05 $\pm$ 4.20	34.80 $\pm$ 3.70	4.25 $\pm$ 1.20	14	34.25 $\pm$ 3.20	28.55 $\pm$ 3.45	5.70 $\pm$ 0.85
					10	33.65 $\pm$ 3.30	29.00 $\pm$ 3.55	4.65 $\pm$ 1.05

The values represent the means $\pm$ the standard error of the means. The substances were injected to the animals intraperitoneally in the following amounts: (1) Rib. 0.5 mg; (2) Rib. 0.5 mg + ATP.Na 1 mg; (3) FMN 0.6 mg; (4) FMN 0.6 mg + ATP.Na 1 mg. (⁰) In these experiments rats were in diabetic coma. () FAD determined enzymatically according to WARBURG and CHRISTIAN (5).

The following abbreviations are used:

FAD	=	flavinadenin dinucleotide
FMN	=	flavinmononucleotide
Rib.	=	riboflavine
ATP	=	adenosin triphosphate

F. NAVAZIO and N. SILIPRANDI

*Institute of Biological Chemistry, University of Rome,
February 18, 1955.*

Riassunto

Gli autori hanno determinato il FAD e la frazione FMN + Rib. nel fegato di ratti normali e diabetici da allossana. Il FAD è stato trovato diminuito in modo significativo nei diabetici. Somministrando riboflavina + ATP si ottiene un aumento dei valori del FAD. Questi valori restano quasi immutati somministrando riboflavina da sola.

PRO LABORATORIO

Zur Mikroabsorptionsspektralanalyse im sichtbaren Spektralgebiet und im UV¹

Die Mikroabsorptionsspektralanalyse, insbesondere im UV, ist in den letzten Jahren wesentlich von CASPERSSON² zu einem wichtigen experimentellen Hilfsmittel für biologische und biochemische Fragestellungen entwickelt worden. Die bisher üblichen Geräte zur Mikroabsorptionsspektralanalyse haben sich aus dem Mikroskop entwickelt, wobei entweder die gewöhnliche Mikroskopierlampe durch einen Monochromator ersetzt oder ein von einem Mikroskopobjektiv entworfenes Bild des Objektes auf einen Spektrometerspalt geworfen wird (vgl. zum Beispiel 2). Entsprechend der mikroskopischen Praxis wird hierbei das Objektfeld meist nach den Prinzipien des Köhlerschen Strahlenganges ausgeleuchtet. In neuerer Zeit werden Spiegelobjektive zur Mikroabsorptionsspektralanalyse herangezogen³, welche durch ihre Achromasie die Einstellung und Justierung der Mikrospektrometer erleichtern.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass die Verwendung von Quarzobjektiven in einer an sich bekannten optischen Anordnung gewisse Vorzüge bietet, die gerade durch die sonst ungünstig beurteilte Nichtachromasie dieser Objektive bedingt sind. Wir haben dabei die von v. ROHR berechneten Zeiss-Objektive mit den Aperturen 0,2, 0,35 und 0,85 (Glyzerinimmersion) verwendet. Bekanntlich ist in einem Gerät zur Spektralanalyse der messbare Extinktionsbereich durch den Anteil an «falschem Licht» begrenzt: an Prismenfassungen, Blenden und Gehäuse gestreutes Licht fremder Wellenlängen gelangt zur Photometriereinrichtung und lässt die Extinktion zu niedrig erscheinen. Bei Geräten zur mikroskopischen Spektralanalyse mit Köhlerscher Beleuchtung tritt noch eine zusätzliche, andersartige Erniedrigung des Messbereiches auf:

Das mikroskopische Objekt liegt in einem gleichmässig ausgeleuchteten Gesichtsfeld. Es kann daher

Strahlung neben dem zu untersuchenden Objekt im Objektiv gestreut werden und so das Messergebnis verfälschen. Der letztere Fehler ist zu beseitigen, wenn man statt der Köhlerschen Beleuchtungsanordnung (für mikroskopische Beobachtung grösserer Flächen gedacht) eine Lichtsonde ähnlich wie im Mikroskopphotometer zur Beleuchtung des interessierenden Objektes wählt, die durch ein Mikroskopobjektiv gebildet werden kann, welches den Monochromatorspalt direkt im Objekt abbildet. Zum Erzielen einer guten Abbildung muss sich der Monochromatorspalt in ungefähr der normalen Tubuslänge von diesem Objektiv entfernt befinden. Gleichzeitig hat man den Vorteil, mit relativ engen Blenden (also spektralreinem Licht) und einem Monochromator kleiner Öffnung trotz guter Intensitätsausbeute arbeiten zu können, da der Monochromator nur noch ein kleines Flächenelement und nicht das gesamte Gesichtsfeld intensiv ausleuchten muss. Ein weiterer wesentlicher Vorteil wird durch die Beseitigung anisotroper Beleuchtungsapertur einer Köhlerschen Anordnung mit Monochromator gewonnen, auf deren störenden Einfluss insbesondere bei Messungen im polarisierten Licht LÜTHY¹ hinwies und die auf der Wirkung des Monochromatorspaltes als Aperturblende beruht. Als Beleuchtungsapertur verwenden wir die Objektivapertur, welche durch geeignete Wahl des Beleuchtungsobjektes beliebig einstellbar ist.

Ferner konnten wir zeigen, dass auch der Einfluss von spektralreinem Licht weitgehend auszuschalten ist, wenn nichtachromatische Mikroskopobjektive zur Beleuchtung und zur Abbildung verwendet werden. Durch eine Blende in der Okularebene ist das Bild des Monochromatorspaltes oder einer an seiner Stelle befindlichen Blende das Bild des zu untersuchenden Objektes gleichzeitig auszublenden. Die Kombination Beleuchtungs- und Abbildungsobjektiv mit Monochromator- und Okularblende wirkt dann als Linsenmonochromator, wobei diese Monochromatisierung bei geeigneter Wahl von Objektiven und Blenden für Übersichtsmessungen sogar den vorgesetzten Monochromator entbehrlich macht. Mit diesem erhält man Ergebnisse, die sonst nur mit dem Doppelmonochromator erzielt werden könnten. Bei einfacherem Aufbau wird die Nachmonochromatisierung ohne Intensitätseinbusse erzielt, und es sind keine zusätzlichen brechenden, beugenden oder spiegelnden Flächen erforderlich.

Für gute Monochromatorwirkung sollte das Bild der Monochromatorblende und der Okularblende möglichst gleich gross sein; was allerdings eine sehr sorgfältige Justierung der optischen Anordnung in die optische Achse bedingt, für die wir (ebenso wie für die Aufnahme der Fokuskurve der Objektive) ein lichtelektrisches Einstellverfahren verwendet haben. Mit auf Quarzblättchen aufgedampften Spalttestobjekten von 0,05 mm wird der maximale Lichtdurchlass bei Abbildung des Spalttestobjektes lichtelektrisch bestimmt. Bei geordneten Veränderungen der Justierbedingungen gestattet das Verfahren in sehr sicherer Weise eine Prüfung der Einstellungen und ist dem Einstellverfahren mit Fluoreszenzeinstellung überlegen.

Die Erhöhung des Extinktionsbereiches ist gerade bei Geräten zur Mikrospektralanalyse sehr willkommen. Bei festen mikroskopischen Objekten (zum Beispiel Kristallen) ist der Absorptionskoeffizient häufig so hoch, dass es allgemein Schwierigkeiten bereitet, genügend dünne Objekte zur Untersuchung zu finden. Es sei hier auch auf die an sich bekannte Tatsache hingewiesen, dass Quarzobjektive grundsätzlich für Untersuchung

¹ Mit Unterstützung der Ciba-Stiftung für chemische, medizinische und technische Forschung.

² T. CASPERSSON, Skand. Arch. Physiol. 73, Suppl. 8 (1936).

³ R. C. MELLORS, Discuss. Faraday Soc. Nr. 9, 398 (1950). – K. P. NORRIS und H. F. WILKINS, Discuss. Faraday Soc. Nr. 9, 360 (1950).

¹ H. LÜTHY, Pflüger's Arch. 253, 477 (1951).

der Anisotropie der Lichtabsorption mit polarisiertem Licht geeigneter sind als Spiegelobjektive, da ihr Strahlengang wegen der nicht abgedeckten Zentralzone geometrisch übersichtlicher ist und gleiche Vergrößerungen mit kleinerer Gesamtapertur erreicht werden können.

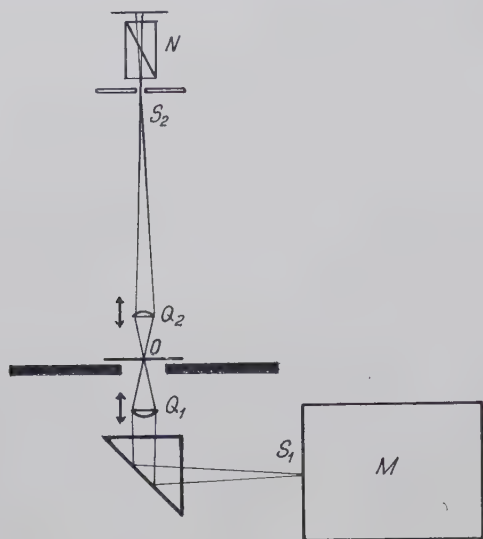


Abb. 1. Strahlengang im Mikroskopspektrometer.

Mögen diese Vorteile bei streuenden Objekten mit kleinem Dichroismus (wie sie häufig in der Biologie vorliegen) von nicht zu grosser Bedeutung sein, so sind sie für die Untersuchung von klaren Objekten mit starker Absorptionsanisotropie (wie sie Kristalle darstellen) von erheblichem Interesse. Quarzobjektive sind nur für eine einzige Wellenlänge korrigiert (zum Beispiel $275\text{ m}\mu$). Doch reicht selbst im sichtbaren Gebiet ($436\text{ m}\mu$) die sphärische Korrektur aus, um zumindest in der Nähe der optischen Achse ausreichende Schärfe zu erhalten.

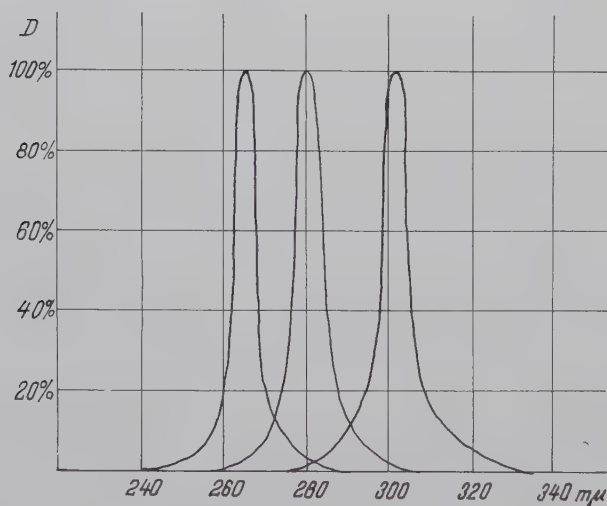


Abb. 2. Durchlässigkeitskurven des durch das Mikroskopspektrometer gebildeten Nachmonochromators.

Abbildung 1 zeigt das Prinzip der von uns verwendeten Apparatur. Der Austrittspalt S_1 eines Gittermonochromators wird durch das Objektiv Q_1 im Objekt O abgebildet; das Objektiv Q_2 bildet seinerseits das Objekt und das Spaltbild im einstellbaren Okularspalt S_2 ab, hinter welchem sich in üblicher Anordnung eine Photo-

zelle mit Sekundärelektronenvervielfacher und Quarzfenster befindet, dessen Ströme durch einen Gleichstromverstärker verstärkt und in einem Drehspulinstrument abgelesen werden. Ein präziser Mikrometerschlitten gestattet das Aus- und Einschwenken des Präparates auf $0,5\text{ }\mu$ genau. Als Lichtquelle kann wahlweise eine Quecksilberhochdruck- oder eine Wasserstoffpunktlichtlampe Verwendung finden. Für Messungen im polarisierten Licht kann ein mit Glycerin gekittetes polarisierendes Prisma vor die Okularphotozelle gebracht werden.

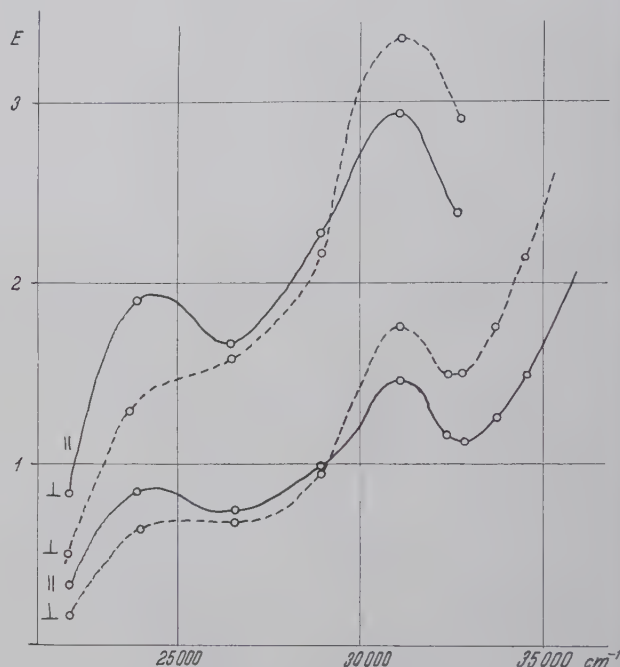


Abb. 3. Absorptionskurven einer Einschlussverbindung von *p*-Nitrophenol in Zinkhydroxyd im linear polarisierten Licht. Verschieden dicke Kristalle.

Abbildung 2 gibt einen Überblick über die monochromatisierenden Eigenschaften einer Quarzobjektivkombination mit den Aperturen 0,2 (Kondensorobjektiv), 0,35 (Abbildungsobjektiv) und einer Spaltgrösse von $14\text{ }\mu \times 28\text{ }\mu$. Die Halbwertsbreite der Durchlässigkeitskurven beträgt weniger als $10\text{ m}\mu$ trotz der relativ grossen Ausblendungsspalte.

In Abbildung 3 sind schliesslich die dichroitischen Absorptionskurven von 2 verschieden dicken Kristallen einer Einschlussverbindung von *p*-Nitrophenol $\text{Zn}(\text{OH})_2$ als Beispiel wiedergegeben; man erkennt, dass bis zu Extinktionen von über 3 die charakteristischen Züge der Absorptionskurven erhalten bleiben. Die Lage des elektrischen Vektors zur Achse des Kristalls ist eingezeichnet.

W. HOPPE

Physiologisches Institut der Universität Bern und
Physikalisch-chemisches Institut der Technischen Hochschule München, den 31. Januar 1955.

Summary

A new instrument for the U.V. spectrometry of microscopic preparations, which uses quartz objectives not only for magnification, but also for monochromatization, permits measurements up to extinctions E of more than 2.

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

STUDIORUM PROGRESSUS

Iodine Adsorption Characteristics of Newly-Formed Rat Liver Glycogen

By D. D. CHAPMAN, J. M. FELTS, and I. L. CHAIKOFF¹, Berkeley

In an earlier study on livers of diabetic rats injected with insulin², attempts were made to measure glycogen by the iodine adsorption method of VAN WAGTENDONK³. Values as high as 26 per cent of the wet weight of the tissue were obtained by this method. These values for glycogen failed to agree with those obtained by the classical method in which the glycogen was hydrolysed with acid and the resulting glucose estimated by its reducing value. It was this discrepancy that led us to study iodine adsorption by glycogen under experimental conditions in which glycogen is rapidly deposited.

Experimental. Treatment of Animals. Normal Rats. Rats of the Long-Evans strain, weighing 200–300 gm, were used. These animals were maintained on an adequate stock diet until three days before they were sacrificed. During those 3 days they were fed a high carbohydrate diet containing 58% glucose, 22% casein, 6% salt mixture, and 14% cellulflour-vitamin mixture. The salt and cellulflour-vitamin mixtures have been described elsewhere².

Diabetic Rats.—Male rats of the Long-Evans strain were made diabetic by an intravenous injection of 45 mg per kilo body weight of alloxan monohydrate (EASTMAN). Records of food and water consumption, urine excretion, weight changes, and glucose excretion in the urine were kept for a period of one month before the start of the experiment. During that time the animals manifested fasting blood glucose levels of 200 mg per cent or higher.

The rats that were to receive insulin were fed the high carbohydrate diet for several days before the start of the insulin injections, and were continued on that diet during the injection periods. The insulin treatments are described in Table 1. Rats that received no insulin were fed the high carbohydrate diet for 3 days and were then sacrificed.

Rats That Were First Fasted and Then Intubated with Glucose.—Rats weighing 200–250 gm were maintained on the stock diet until the start of the fasting period, which lasted for 18 h. At the end of the 18 h, each rat was intubated with 3 gm of glucose in a 50% solution, and was allowed access to the high carbohydrate diet until sacrificed. Pairs of these rats were sacrificed at 3, 6, 9, 12, 18, and 24 h after intubation of the glucose.

Methods. Hydrolysis of Tissue.—The rats were sacrificed by cervical fracture. Their livers were excised, placed in iced saline, and then sliced freehand as rapidly as possible. Quadruplicate samples of about 500 mg each were removed, blotted, and weighed. The samples were placed in 6 ml of hot 30% (w/v) KOH and digested for 2 h at 100°. The mixture was cooled, transferred to volumetric flasks, and made to volume with the 30%

KOH. This digest was filtered through Whatman No. 41 filter paper to remove soaps and other insoluble components. Suitable aliquots of the filtrate were taken for the analysis of glycogen as described below.

Glycogen Analyses. Titrimetric Method.—0.5 ml of a saturated solution of Na₂SO₄ was added to a suitable aliquot of the filtrate, and the resulting solution was mixed with 1.2 volumes of ethyl alcohol¹. The mixture was stored at 0° for 3 h, then centrifuged, and the precipitate thus obtained was dissolved in 2 ml of 1N HCl. The glycogen was hydrolysed for 2 h at 100°. The hydrolysate was neutralized with NaOH and Na₂CO₃, clarified with Zn(OH)₂², and centrifuged. Glucose was determined in the supernatant by the ferricyanide-ceric sulfate method³. The titration values were referred to a glucose standard, and are expressed as per cent glycogen (as glucose) of the wet weight of the liver.

Determination of Glycogen by Iodine Adsorption.—The method used was essentially that of VAN WAGTENDONK *et al.*⁴. The optical density was determined at 500 mμ, with all solutions carefully maintained at exactly the same temperature. A Model DU Beckman Spectrophotometer was used for the measurement of the iodine complex. The optical density of the iodine-glycogen complex was found to obey BEER's Law only when the electrolyte concentration was held rigidly constant. Each experimental group of rats included a normal animal whose liver glycogen served as a standard for the calibration of optical density of a given glycogen sample in terms of glucose.

Preparation of Purified Glycogen.—Rats that had been treated as described above were sacrificed by cervical fracture. Their livers were quickly removed, weighed, and transferred to two volumes of hot 30% NaOH. Digestion was carried out for 2 h at 100°C in a nitrogen atmosphere. Glycogen was isolated as outlined by SOMOGYI⁵, then dried *in vacuo* at 60° for at least 24 h. Samples of these purified glycogens were weighed and then dissolved in water. Optical density readings were carried out at 25° on a solution containing the following per milliliter: 0.1 mg glycogen, 5 mg KCl, 3 mg KI, and 0.5 mg I₂. This solution, minus glycogen, was used as a blank against which samples were read. The readings were then referred to a sample of normal glycogen that had been purified in the same manner. Light scattering at this glycogen concentration is negligible.

Results.—Each liver was digested with KOH, as described above, and separate aliquots of each digest were taken for the analyses of glycogen by the two methods under consideration. Table I shows results obtained with a series of livers excised from 15 diabetic rats (12 of which had been under the influence of insulin for varying periods before they were sacrificed). The values obtained by the two methods were in fair agreement in the case of the untreated, diabetic rat livers. But a discrepancy—in some cases quite pronounced—was observed when glycogen samples obtained from insulin-treated, diabetic rats were analysed by the two methods.

¹ From the Department of Physiology of the University of California, School of Medicine, Berkeley.

² J. M. FELTS, I. L. CHAIKOFF, and M. J. OSBORN, *J. Biol. Chem.* **191**, 683 (1951).

³ W. J. VAN WAGTENDONK, D. H. SIMONSEN, and P. L. HACKETT, *J. Biol. Chem.* **163**, 301 (1946).

¹ B. SJÖGREN, T. NORDENSKJÖLD, H. HOLMGREN, and J. MÖL-
LERSTRÖM, *Arch. ges. Physiol.* **240**, 427 (1938).

² M. SOMOGYI, *J. Biol. Chem.* **86**, 655 (1930).

³ W. Z. HASSID, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* **8**, 138 (1936).

⁴ W. J. VAN WAGTENDONK, D. H. SIMONSEN, and P. L. HACKETT, *J. Biol. Chem.* **163**, 301 (1946).

⁵ M. SOMOGYI, *J. Biol. Chem.* **104**, 245 (1934).

Table I.—A Comparison of Glycogen Values of Livers of Alloxan-Diabetic Rats, with and without Insulin Injections, as Determined by Reducing Value of the Hydrolyzed Glycogen and by Iodine Adsorption of the Intact Glycogen Molecule

Rat	Treatment	Glycogen as glucose p. cent of wet weight	
		By reducing value	By iodine adsorption
4	None	5.55	5.32
5	None	3.65	4.36
6	None	2.36	2.80
7	Insulin treatments for 12 h ¹	11.0	19.7
8	Insulin treatments for 12 h ¹	12.4	21.8
9	Insulin treatments for 24 h ²	13.5	16.8
10	Insulin treatments for 24 h ²	13.1	17.2
11	Insulin treatments for 24 h ²	12.5	25.9
12	Insulin treatments for 24 h ²	8.91	12.7
13	Insulin treatments for 48 h ³	8.19	13.9
14	Insulin treatments for 48 h ³	8.87	8.07
15	Insulin treatments for 48 h ³	4.21	5.96
16	Insulin treatments for 72 h ⁴	3.91	3.85
17	Insulin treatments for 72 h ⁴	5.42	8.99
18	Insulin treatments for 72 h ⁴	3.76	4.71

¹ Each rat received an injection of protamine-zinc insulin, 40 units per kilo body weight, 12 h before sacrifice, and the same dose of regular insulin exactly 2 h before sacrifice.
² Each rat received an injection of protamine-zinc insulin, 40 units per kilo body weight, 24 h before sacrifice and the same dose of regular insulin exactly 2 h before sacrifice.
³ Each rat received injections of protamine-zinc insulin, 40 units per kilo, body weight, at 48 h and 24 h before sacrifice and the same dose of regular insulin 2 h before sacrifice.
⁴ Each rat received injections of protamine-zinc insulin, 40 units per kilo body weight, at 72, 48, and 24 h before sacrifice and the same dose of regular insulin exactly 2 h before sacrifice.

Table II.—A Comparison of Glycogen Values of Livers of Normal Rats, First Fasted 18 h, Then Intubated with Glucose, as Determined by Reducing Value of the Hydrolyzed Glycogen and by Iodine Adsorption of the Intact Glycogen Molecule

Rat	Treatment*	Per cent glycogen as glucose (wet wt. basis)	
		By reducing value	By iodine adsorption
1	Sacrificed 3 h after intubation	1.24	1.33
2	Sacrificed 3 h after intubation	1.20	1.09
3	Sacrificed 6 h after intubation	3.21	4.58
4	Sacrificed 6 h after intubation	4.84	8.71
5	Sacrificed 9 h after intubation	8.43	13.2
6	Sacrificed 9 h after intubation	5.68	9.11
7	Sacrificed 12 h after intubation	6.27	10.7
8	Sacrificed 12 h after intubation	8.38	14.4
9	Sacrificed 18 h after intubation	10.6	27.3
10	Sacrificed 18 h after intubation	13.6	28.9
11	Sacrificed 24 h after intubation	12.2	22.7
12	Sacrificed 24 h after intubation	9.42	14.4

* Rats were first fasted 18 h, then stomach-tubed with 3 gm of glucose in a 50% solution, and allowed access to the high carbohydrate diet until sacrificed.

In order to represent the degree to which values obtained by the iodine method deviated from those obtained by the titration method, we have made use of a ratio, *R*, which is:

$$\frac{\text{per cent tissue glycogen by colorimetric method}}{\text{per cent tissue glycogen by titrimetric method}}$$

R values were calculated from the data of each liver given in Table 1, and the average *R* value for each group was plotted against the duration of insulin treatments in Figure 1. The average *R* value for the uninjected, diabetic livers is given at zero time, and is approximately 1.

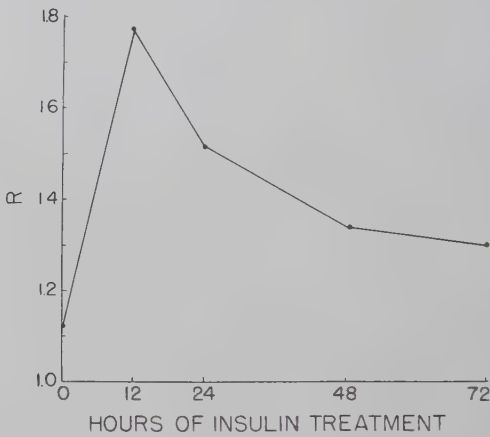


Fig. 1.—Change of ratio *R* (see text) with time in the case of diabetic rats injected with insulin. Rats received 40 units of protamine-zinc insulin per kilo body weight at 0 time and at each 24-hour period thereafter. In addition, each animal received 40 units of unmodified insulin just 2 h before sacrifice. Thus, rats were under the influence of insulin for 12 to 72 h. Each point represents the average of determinations on 2–4 animals.

The iodine adsorption characteristics of the liver glycogen of uninjected, alloxan-diabetic rats closely approximate those of the normal rats (the *R* value for liver glycogen of normal rats is taken as 1). It should be noted that the highest *R* value was observed in the early periods after the start of insulin treatments and that, with continued insulin administrations, the *R* values fell.

The shape of the curve shown in Figure 1 suggested that a high *R* value (i.e., a high iodine adsorption) might be characteristic of rapidly-formed glycogen. In order to test this hypothesis, experiments were carried out on rats that were first fasted for 18 h, to deplete their glycogen stores, and then intubated with glucose to induce rapid glycogenesis. Immediately after the intubation, these animals were fed *ad libitum* the high glucose diet, and were sacrificed from 3 to 24 h after the intubation. The results are shown in Table II and Figure 2. Each point in Figure 2 is the average of the two *R* values obtained at a given time interval. The *R* value at the 3-h interval was essentially unity, but by the time 6 h had elapsed after the intubation of glucose, a marked rise in the value for *R* was observed, which attained a maximum at 18 h. These findings support the idea that liver glycogen that is rapidly deposited in response to (1) an insulin injection in the diabetic, or (2) glucose administration in a normal, fasted rat has a much greater iodine adsorption capacity than does liver glycogen of an animal in the steady state.

In order to rule out the possibility that the differences in iodine adsorption among the glycogen samples could

be due to the presence of iodine-adsorbing compounds other than glycogen, samples of glycogen prepared from diabetic rats and from insulintreated, diabetic rats were

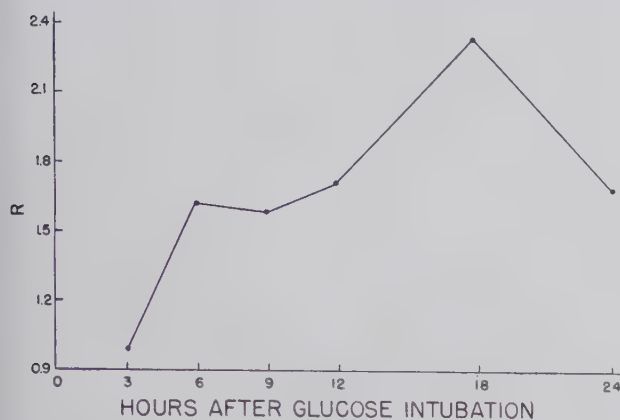


Fig. 2.—Change of ratio R (see text) with time in the case of norm α -rats, first fasted for 18 h, then intubated with 3 gm of glucose at 0 time, and allowed access to a high carbohydrate diet thereafter. Points represent averages of determinations on pairs of animals sacrificed at the intervals indicated.

purified according to the method of SOMOGYI¹. This procedure yields a product relatively free of salt, nitrogen, and phosphorus, and involves extraction with lipid solvents. The optical densities per milligram of glycogen were determined, and were referred to a sample of purified glycogen prepared from the liver of a rat in the steady state. At each time interval, the values for R were essentially the same as those shown in Figure 1.

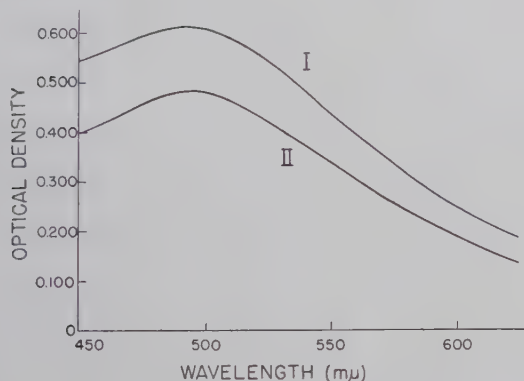
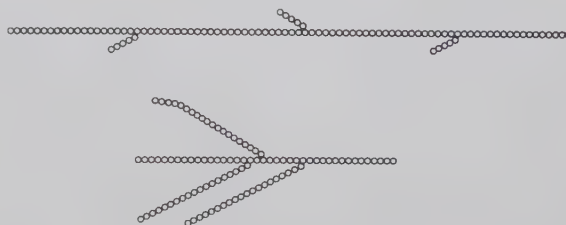


Fig. 3.—Absorption spectra of glycogen-iodine complex obtained with samples of purified glycogen. (i) Liver glycogen from a rat first fasted, then intubated with glucose, and sacrificed 6 h later. (ii) Liver glycogen from normal rat. Conditions of optical density measurements: glycogen, 0.1 mg per milliliter; KCl, 5 mg per milliliter; KI, 3 mg per milliliter; I_2 , 0.5 mg per milliliter; $T = 25^\circ$. Blank identical but without glycogen.

The optical densities referred to above were measured at a 500 $m\mu$. The absorption spectra of two purified glycogen samples were also determined. One sample was obtained from a normal rat, the other from a rat that first had been fasted for 18 h, then intubated with 3 gm of glucose, and finally sacrificed 6 h after the glucose intubation. The results, shown in Figure 3, indicate that although the color intensity per unit weight of glycogen differed in the two glycogen samples, the values for R calculated from these spectra over the range of 450 to

700 $m\mu$ remained constant at 1.3. Thus, there is no apparent qualitative difference in the absorption spectra of the glycogen-iodine complexes of the two glycogen samples.

Discussion.—In the process of rapid glycogen deposition in the liver, a component appears with an iodine adsorption capacity relatively higher than that observed in glycogen found in the steady state. This higher iodine adsorption may result, in part, from the formation of a different species of polysaccharide or from a complexing moiety in relatively greater abundance than that present in steady-state glycogen. In experiments with diabetic rats which were first fasted for 24 h, then fed glucose and sacrificed 3 h later, LASZT¹ demonstrated, by fractional precipitation, the production of glycogen fractions which differ in their ability to complex iodine. Since he observed no difference in end-group analyses of these fractions, the essential basis for difference in iodine adsorption of various glycogen samples might lie in the distribution of glucose moieties within the molecule. This is illustrated in the following diagram by the two portions of glycogen molecules which, though having the same degree of branching, i.e., the same number of glucose moieties per end group, differ considerably in shape and distribution of chain length.



This difference is subject to detection by exhaustive phosphorylase degradation, and such a study, as well as a study correlating chain length with intensity of the resulting complex, is in progress.

Since the differences in the iodine adsorption of the various liver glycogen samples studied here are correlated with the age of the glycogen, it is not unreasonable to assume that the newlyformed glycogen contains many more molecules per unit weight than does a glycogen sample obtained from an animal in the steady state. The postulate that iodine adsorption in polysaccharides is a micellar surface phenomenon has received little support from experimental findings². An explanation of our findings might lie in a less sterically-hindered approach of the iodine to the complexing site in the smaller molecule. The possible correlation of iodine adsorption ability with molecular weight is also the subject of investigation in this laboratory.

Data presented here and by other workers demonstrate that wide differences in iodine adsorption values for liver glycogen can be obtained from animals in a variety of experimental conditions or by the administration of various sugars³. However, the accumulated evidence indicates that the properties of the "abnormal glycogens" formed under such conditions is attributable to the rate at which glucose units are made available for glycogen synthesis.

¹ L. LASZT, *Exper.* 10, 302 (1954).

² K. H. MEYER and G. C. GIBBONS, *Adv. Enzymology* 12, 341 (1951).

³ L. LASZT, *Exper.* 10, 302 (1954). — M. SCHLAMOWITZ, *J. Biol. Chem.* 188, 145 (1951); 190, 519 (1951).

¹ M. SOMOGYI, *J. Biol. Chem.* 104, 245 (1934).

It is apparent from the findings presented here that colorimetric methods based on iodine adsorption cannot always be used for the quantitative determination of glycogen in liver. Certain difficulties encountered with the use of the iodine color method have already been pointed out by MORRIS¹. He found that temperature, salt concentration, and source of "standard" glycogen are critical factors, and stressed the point that standard samples of glycogen should be isolated from the same tissue as that under investigation. But, as shown in the present study, the colorimetric method is further limited by the fact that the physical characteristics of the glycogen responsible for the color intensity of the iodine-glycogen complex are extremely sensitive to the physiological state of the animal. Thus, valid measurements of tissue glycogen cannot be made by the iodine method when a rapid deposition of the polysaccharide has taken place.

Aided by a grant from Eli Lilly and Company.

Zusammenfassung

Es wird für die Bestimmung des Leberglykogens eine Jod-Adsorptionsmethode mit der üblichen Hydrolyse zu Glukose verglichen. Für normale und unbehandelte diabetische Ratten zeigen die Glykogenwerte mit beiden Methoden gute Übereinstimmung. Dagegen ist die Farbintensität je Gewichtseinheit des Jod-Glykogen-Komplexes bei insulinbehandelten diabetischen Ratten ebenso wie bei fastenden glukosegefütterten Ratten wesentlich grösser als bei normalen Tieren. Daraus lässt sich schliessen, dass frisch gebildetes Glykogen eine erhöhte Jod-Adsorptionsfähigkeit besitzt. Qualitativ erfährt die Farbe des Jod-Glykogen-Komplexes unter den verschiedenen Bedingungen keine Veränderung.

¹ D. L. MORRIS, J. Biol. Chem. 166, 199 (1946).

STUDIORUM PROGRESSUS

Die Dehnbarkeit des Skelett- und Herzmuskels der Schildkröte während der Latenzzeit

Von H. REICHEL und A. BLEICHERT¹, München

Die ersten Elastizitätsuntersuchungen am Muskel während der sogenannten Latenzzeit (das heisst der Zeit, die vom Augenblick des Reizes bis zum ersten eben nachweisbaren Anstieg der Spannung über die Ausgangsspannung verstreicht) sind von HILL² durchgeführt worden. Wenn der Muskel schnellen Dehnungen um etwa 10 % seiner Länge unterzogen wird, dann steigt noch während der Latenzzeit die Spannung des gereizten Muskels stärker an als die des ruhenden, nicht gereizten Muskels. Aus diesem Befund schliesst HILL, dass das kontraktile Material infolge des Reizes weniger dehnbar werde, und zwar schon zu einem Zeitpunkt, in dem die Verkürzung der kontraktile Elemente nach aussen noch nicht manifest werde. BUCHTHAL und ROSENFALCK³ haben an Einzelfasern in isotonischer

Anordnung durch periodische Änderung der Last gleichfalls die Elastizität während der Latenzzeit untersucht und wie HILL eine Abnahme der Dehnbarkeit vor Beginn der Kontraktion gefunden. Auch die Messungen der Torsionselastizität durch STEN KNUDSEN⁴ haben dasselbe Resultat ergeben, obwohl natürlich ein Rückschluss aus diesen Befunden auf das Verhalten der Längselastizität nicht ohne weiteres möglich erscheint.

Nach unseren eigenen experimentellen Erfahrungen kommt es bei den Untersuchungen der Dehnbarkeit auf den mechanischen Ausgangszustand an, in dem sich der Muskel vor dem Versuch befindet. In der Arbeit von BUCHTHAL und ROSENFALCK² fehlen darüber nähere Angaben. Die Befunde von HILL sind an Muskeln erhoben worden, deren Ausgangslänge wesentlich kleiner als ihre Ausgangslänge *in situ* ist. Unter diesen Bedingungen rufen aufeinanderfolgende Dehnungen auch am ruhenden Muskel verschiedenen steile Spannungsanstiege hervor. Im nicht vorgedehnten Zustand hat der Muskel plastische Eigenschaften; seine Strukturen werden daher bei starken Dehnungen nicht nur elastisch beansprucht, sondern auch in ihrem Gefüge und in ihrer Anordnung geändert (REICHEL⁵). Solche plastischen Nebeneffekte erschweren eine eindeutige Aussage über das elastische Verhalten des Muskels erheblich. Bei der grundsätzlichen Bedeutung der Hillschen Befunde (s. WEBER und PORTZEHL⁴) halten wir es für notwendig, die Elastizitätsuntersuchungen während der Latenzzeit mit einer Methode zu wiederholen, die plastische Nebeneffekte ausschliesst.

Methodik. Wir haben uns einer früher beschriebenen Methode (PIEPER, REICHEL und WETTERER⁵) bedient, mit der dem Muskel nach dem zum ersten Mal von BUCHTHAL und KAISER⁶ angegebenen Prinzip sinusförmige Längenänderungen hoher Frequenz aufgezungen werden. Die resultierenden Spannungsamplituden sind dann ein Mass für die Steifheit des Muskels oder für den reziproken Wert seiner Dehnbarkeit. Die benutzten Längenänderungen sind relativ klein (1–4 % der sogenannten «Standardlänge», die der Muskel *in situ* einnimmt, s. HILL⁷). Als Ausgangsspannung wird in den meisten Fällen eine Spannung gewählt, die weniger als 1 % der isometrischen Gesamtspannung im Gipfel der Einzelzuckung beträgt. Der Spannungsbereich, in dem die durch die Längenänderungen hervorgerufenen Spannungsamplituden sich bewegen, ist daher sehr klein; das Minimum der Spannungsamplituden liegt gewöhnlich bei Null. Dadurch wird die Möglichkeit ausgeschlossen, dass nicht nur die kontraktile Ketten, sondern auch etwaige parallel zu ihnen liegende Strukturen elastisch mitbeansprucht werden (über die Frage des sogenannten parallel elastischen Elements siehe im übrigen REICHEL⁸). Die Wahl einer niedrigen Ausgangsspannung bei kleinen Längenänderungen bietet ausserdem den Vorteil, dass die plastischen Nebeneffekte unbedeutend sind. Einzelne Versuche sind auch bei höheren Ausgangsspannungen durchgeführt worden. Soweit in diesen Versuchen plastische Effekte vorhanden sind, werden sie einige Zeit nach Ein-

¹ O. STEN KNUDSEN, Acta physiol. scand. 23, Suppl. 104 (1953).

² F. BUCHTHAL und P. ROSENFALCK, Abstr. Communic. XIX. Internat. Physiol. Congr. Montreal 1953, 244.

³ H. REICHEL, Erg. Physiol. 47, 469 (1953).

⁴ H. H. WEBER und H. PORTZEHL, Erg. Physiol. 47, 369 (1953).

⁵ H. PIEPER, H. REICHEL und E. WETTERER, Z. Biol. 104, 469 (1951).

⁶ F. BUCHTHAL und E. KAISER, Acta physiol. scand. (Stockholm) 8, 38 (1944).

⁷ A. V. HILL, Proc. roy. Soc. [B] 137, 320 (1950); 138, 339 (1951).

⁸ H. REICHEL, Erg. Physiol. 47, 469 (1953).

¹ Aus dem Physiologischen Institut der Universität München.

² A. V. HILL, Proc. roy. Soc. [B] 137, 320 (1950); 138, 339 (1951); 138, 329 (1951).

³ F. BUCHTHAL und P. ROSENFALCK, Abstr. Communic. XIX Internat. Physiol. Congr. Montreal 1953, 244.

schalten des Motors, der die sinusförmigen Längenänderungen erzeugt, an einem langsamen Abfall der Spannungsamplituden erkannt. Innerhalb einiger Minuten stellen sich aber die Amplituden der Spannungsänderungen regelmässig auf einen konstanten Endwert ein.

Als Versuchsobjekte werden der *M. scapuloantibrachii* und der Herzstreifen der Schildkröte (*testudo Graeca*) benutzt, die vor anderen Präparaten den Vorteil einer langen Kontraktionsdauer und einer entsprechenden langen Latenzzeit haben. Durch Abkühlung auf $0-5^{\circ}\text{C}$ wird die Latenzzeit zusätzlich so verlängert (bis auf 100 ms beim Skelettmuskel und bis auf 500 ms beim Herzmuskel), dass bei genügend hoher Frequenz der sinusförmigen Längenänderungen (20–80 Hz) wenigstens 3 Spannungsamplituden in die Zeitspanne zwischen Reiz und Beginn der isometrischen Kontraktionskurve fallen. Die Objekte werden in von Sauerstoff durchpflorter, gepufferter Lösung nach BARKAN, BROEMSER und HAHN¹ mit Glukosezusatz gehalten. Unter diesen Bedingungen bleiben die Muskeln über Stunden voll funktionsfähig.

Die Einspannung der Objekte ist dieselbe wie in früheren Arbeiten. Der Skelettmuskel wird mit Seidenfaden zwischen Längen- und Spannungshebel kurz angebunden. Die Dehnbarkeit des Seidenfadens geht zwar in die Messungen als Fehler ein, ist aber relativ zu der des Muskels sehr gering und spielt für die Vergleichsmessungen keine Rolle. Der Herzstreifen wird als Ring aus dem Ventrikel der Schildkröte ausgeschnitten; durch den Ring werden zwei Leukoritröllchen geschoben, von denen das eine unmittelbar am Längenhebel befestigt, das andere mit Drahtbügel am Spannungshebel eingehängt wird.

Als Reizelektroden werden Silberblechstreifen benutzt, die den Objekten über die ganze Länge anliegen. Dadurch wird eine gleichzeitige Erregung der ganzen Muskellänge gewährleistet. Bei den Skelettmuskelversuchen liegt das Objekt zwischen zwei Silberblechstreifen, von denen der eine als Kathode, der andere als Anode geschaltet ist. Bei den Herzmuskelversuchen sind beide Blechstreifen Kathoden, während als Anoden zwei Silberdrähte dienen, die in den beiden Leukoritröllchen eingelassen sind. Der Reiz besteht in einer Kondensatorentladung (Spitzenpotential 5 V). Die Reizauslösung erfolgt automatisch nach Öffnung des Kymoverschlusses bei einer bestimmten Stellung der Kymographiontrommel.

Bei jedem Einzelversuch wird eine isometrische Kontraktion mit und ohne aufgesetzte Spannungsänderungen auf ein und denselben Filmstreifen registriert. Als Beginn der Latenzzeit wird der Reizeinbruch, als ihr Ende der erste eben messbare Anstieg der isometrischen Kontraktionskurve ohne aufgesetzte Spannungsänderungen markiert. Zur Bestimmung dieses Zeitpunktes wird eine Glasplatte mit eingraviertem Millimeternetz an die gleichzeitig registrierte Nullinie angelegt. Auf dieselbe Weise werden Spannungsamplituden vor, während und nach der Latenzzeit ausgemessen. Der Fehler der Latenzzeitbestimmung ist im Durchschnitt nicht grösser als $\pm 5\%$; die maximale Fehlerbreite der Spannungsmessung beträgt 5%. Die zur Spannungsmessung verwandten Blattfedern haben Eigenschwingungszahlen von 500 bis 900 Hz, die Empfindlichkeit ist 3,5 cm Ausschlag für 10 g. Bei dieser Empfindlichkeit lässt die Anordnung eine geringe Verkürzung des Muskels um maximal 0,25% seiner Gesamtlänge zu; insofern sind also die Bedingungen nicht rein isometrisch.

Während eines jeden Einzelversuches ist auf strenge Temperaturkonstanz der Badeflüssigkeit geachtet worden. Im ganzen sind 5 Versuche am Skelettmuskel mit etwa 60 auswertbaren Einzelaufnahmen und 3 Versuche am Herzmuskel mit etwa 40 auswertbaren Einzelaufnahmen durchgeführt worden.

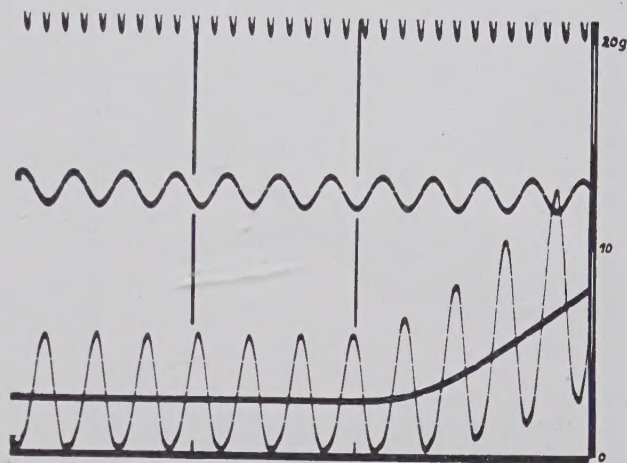


Abb. 1. Originalkurve. Skelettmuskel der Schildkröte. Von oben nach unten: 1 Zeitmarke (1/100 s), 2 Länge ($\Delta l = 0,209 \text{ mm} = 0,7\% l_0$), 3 Spannung mit aufgezwungener Längenänderung, 4 Spannung ohne Längenänderung, 5 Nullinie. Die Latenzzeit ist durch die beiden senkrechten Striche angegeben. Dehnungsfrequenz 37 Hz, $l_0 = 30 \text{ mm}$, Latenzzeit = 87,7 ms, Temperatur $0,2^{\circ}\text{C}$.

Ergebnisse. Abbildung 1 zeigt eine typische Aufnahme, die am Skelettmuskel gewonnen worden ist. Einzelheiten sind aus der Legende zu ersehen. Die Spannungsamplituden bleiben durch die ganze Latenzzeit dieselben. Auch am zeitlichen Ablauf der Spannungsänderungen sind keine Unterschiede zu erkennen. Im Augenblick, in dem die Kontraktionskurve sich über ihr Ausgangsniveau erhebt, steigen auch die Spannungsamplituden steil an.

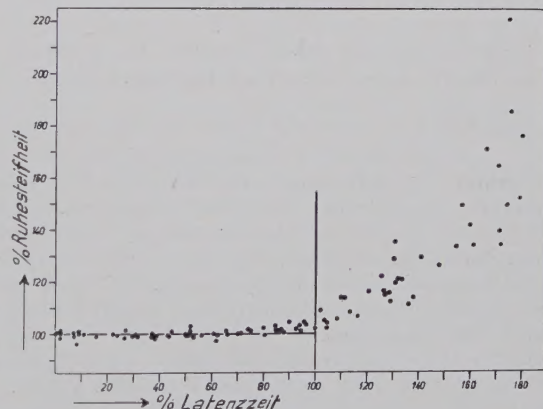


Abb. 2. Auswertung eines Versuches am Skelettmuskel. Ausgangsspannung im Dehnungsminimum = 0–4,6 g, Dehnungsfrequenz 9–53 Hz, Längenänderung 0,209–0,604 mm = 0,7–2,01% l_0 , Standardlänge $l_0 = 30 \text{ mm}$, Temperatur = $0,5-2,5^{\circ}\text{C}$. Latenzzeit 62–130 ms.

Abbildung 2 zeigt das Ergebnis der Aufnahmen eines ganzen Versuches bei verschiedener Temperatur, Ausgangsspannung und Frequenz der Längenänderungen. Aus dieser Abbildung geht hervor, dass auch unter den verschiedensten Bedingungen die Steifheitswerte (als Prozent der Spannungsamplitude in ruhendem Zustand

¹ G. BARKAN, PH. BROEMSER und A. HAHN, Z. Biol. 74, 1 (1922).

angegeben) erst nach Abklingen der Latenzzeit sich deutlich über die 100-Prozent-Marke erheben. Einige Punkte liegen bereits vor Beginn der Kontraktion über dem Ruhewert. Die Abweichungen sind aber so gering (maximal 6%), dass sie nicht als Änderungen der Dehnbarkeit gewertet werden können.

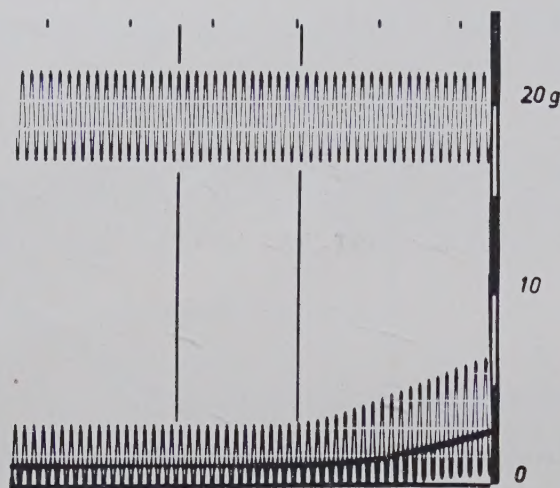


Abb. 3. Originalkurve. Herzmuskel der Schildkröte. Reihenfolge der Kurven wie in Abbildung 1. Längenänderung $\Delta l = 0,604 \text{ mm} = 2,1\% l_0$, Ausgangslänge des Ringes bei der Spannung 0 $l_0 = 22 \text{ mm}$, Dehnungsfrequenz = 44,7 Hz, Temperatur $5,8^\circ \text{C}$, Latenzzeit 295 ms, Zeitmarke: $\frac{1}{5} \text{ s}$.

Abbildung 3 zeigt das entsprechende Verhalten des Herzmuskels. Auch hier bleibt das Band der Spannungsamplituden über die Dauer der Latenzzeit unverändert. Eine Auswertung der Aufnahme wie in Abbildung 2 ergibt denselben Kurvenverlauf.

Diskussion. Die Befunde zeigen eindeutig, dass sich die dynamische Dehnbarkeit während der Latenzzeit nicht ändert. Unsere Ergebnisse widersprechen zunächst den von HILL¹ mit seiner «Quick stretch»-Methode erhobenen Befunden. Der Widerspruch erklärt sich aber zwanglos aus den verschiedenen Versuchsbedingungen. Wie in der Einleitung bereits erörtert wurde, schliesst die von HILL¹ angewandte Technik und die besondere Vorbehandlung des Muskels (isotonische Vorverkürzung auf Längen, die weit unter der Standardlänge liegen) nicht das Auftreten plastischer Effekte aus, die den Verlauf der Spannungskurve bei einer plötzlichen Dehnung entscheidend beeinflussen können. Dafür spricht auch der zur Zeitabszisse konkav gekrümmte Verlauf der Hillschen Spannungskurven bei annähernd linearer Geschwindigkeit der Dehnung. Bei einer Dehnung, die nur die elastischen Strukturen ohne plastische Nebeneffekte beanspruchen würde, wäre eine Spannungskurve zu erwarten, die wie üblich nach der Längen- oder hier nach der Zeitabszisse konvex verläuft.

HILL¹ nimmt an, dass die Elastizität des ruhenden Muskels vorwiegend oder ausschliesslich von parallel elastischen Strukturen getragen werde (siehe hierzu REICHEL²); deswegen sei die Elastizität des erregten

Muskels während der Latenzzeit nur dann zu erfassen, wenn die parallel elastischen Elemente nicht ins Spiel kommen, also nur bei Längen, die unterhalb der Standardlänge liegen. Wir haben aus diesem Grunde in vielen Versuchen Spannungen angewendet, die nur wenig oder gar nicht von Null abwichen. Wir haben ferner in der Mehrzahl der Versuche die Längenänderungen so klein gewählt, dass die Maxima der Spannungsamplituden nur wenige Prozent der isometrischen Gesamtspannung ausmachen. In diesem Spannungsbereich ist ein nennenswerter Anteil der parallel elastischen Elemente auch nach den Angaben von HILL unwahrscheinlich. Bei höheren Spannungen wäre unter der Annahme der Richtigkeit der Hillschen Anschauungen¹ eine Addition der Spannung des parallel elastischen und des in der Latenzzeit bereits beanspruchten Serienelementes zu erwarten. Das hätte zwangsläufig eine Überhöhung der Spannungsamplitude über den Ruhewert in unseren Versuchen zur Folge.

Nach HILL² soll das kontraktile Material sich in Ruhe in einem nahezu plastischen Zustand befinden, während die elastischen Serienelemente schlaff und elastisch kaum beansprucht seien. Die isometrische Kontraktion könne daher erst dann nach aussen manifest werden, wenn die kontraktile Elemente die elastischen Serienelemente so weit vorgedehnt haben, dass sie in der Lage sind, messbare elastische Kräfte zu entwickeln. Die Wirkung einer starken Dehnung während der Latenzzeit bestehe nun gerade darin, dass sie die elastischen Elemente vorzeitig dehne und daher noch vor Beginn der normalen isometrischen Kontraktionskurve zu einem Anstieg der Spannung über den Ruhewert führe. Man könnte daher gegen unsere Versuche einwenden, dass die von uns benutzten Längenänderungen zu klein sind um den von HILL² angenommenen Effekt sichtbar zu machen. Eine einfache Überschlagsrechnung zeigt aber, dass dies nicht der Fall ist: die maximal isotonische Verkürzungsgeschwindigkeit des Froschskelettmuskels (*M. sartorius*) beträgt nach HILL¹ $2,0 l_0/s$ (l_0 = Standardlänge). Der Schildkrötenmuskel ist etwa achtmal langsamer als der *Sartorius* des Frosches. Das ergibt für einen Muskel von 30 mm Standardlänge eine maximale Geschwindigkeit der Verkürzung von 7,5 mm/s. Unter der extremen Annahme, dass die kontraktile Elemente bereits im Beginn der Latenzzeit sich mit dieser Maximalgeschwindigkeit verkürzen, würde nach einer Latenzzeit von etwa 90 ms die Verkürzung des kontraktile Elementes bzw. die Dehnung des Serienelementes 0,68 mm betragen. Die von uns benutzten Längenänderungen betragen bis zu 1,15 mm; sie müssten also ausreichen, einen nach aussen sichtbaren Spannungsanstieg über den Ruhewert während der Latenzzeit hervorzurufen. Eine analoge Berechnung für den Herzmuskel führt zu demselben Ergebnis.

Summary

By means of a method permitting the continuous measurement of the dynamic stiffness of elastic structures, it was shown on the skeletal and heart muscle of the tortoise that during the latent period the elasticity remains unchanged in relation to the resting value.

¹ A. V. HILL, Proc. roy. Soc. [B] 137, 320 (1950); 138, 339 (1951).

² H. REICHEL, Erg. Physiol. 47, 469 (1953).

¹ A. V. HILL, Proc. roy. Soc. [B] 138, 339 (1951).

² A. V. HILL, Proc. roy. Soc. [B] 137, 320 (1950); 138, 339 (1951).

Die Forschungslaboratorien der Sandoz A.G. haben einen entscheidenden Anteil an der Reindarstellung und Konstitutionsaufklärung der herzwirksamen Glykoside und leisteten wesentliche Beiträge zu deren pharmakologischen Erforschung.

Aus diesen grundlegenden Arbeiten resultierten für die Therapie der Herzkrankheiten folgende Spezialpräparate:

Acylanid

Cedilanid

Digilanid

Scillaren

Strophosid



S A N D O Z A . G .

ELEMENTE DER MATHEMATIK VOM HÖHEREN STANDPUNKT AUS

Neuerscheinung Band III: H. Hadwiger

Altes und Neues über konvexe Körper

(1955) 116 Seiten mit 17 Figuren, broschiert Fr. 13.50

Inhalt

Vorwort: Konvexe Körper-Approximations- und Symmetrisierungssätze – Die vier fundamentalen Masszahlen – Ungleichungen – Formeln und Lehrsätze der Integralgeometrie – Literaturverzeichnis – Sachverzeichnis. – Die Theorie der konvexen Körper des gewöhnlichen Raumes ist ein anschauliches und an reizvollen Fragestellungen und Ergebnissen reiches Gebiet der elementaren Geometrie. – In den letzten Dezennien sind sachlich und methodisch auch hier manche Fortschritte erzielt worden. Solche sind in der vorliegenden Schrift, die vor allem den fundamentalen Masszahlen der Eikörper (Volumen, Oberfläche und Integral der mittleren Krümmung) gewidmet ist, zusammen mit Alt-bekanntem verarbeitet worden. – Ein besonderes Anliegen des Verfassers war es, möglichst einheitlich die mengengeometrische Methode zur Geltung zu bringen; diese schliesst unmittelbar an die Grundtatsachen der Elementargeometrie und der Punktmengenlehre an, verwendet die einfachsten Begriffe der reellen Analysis und vermeidet den Einsatz höherer analytischer, insbesondere differential-geometrischer Hilfsmittel.

Bis jetzt sind erschienen: Band I: L. LOCHER-ERNST, *Einführung in die freie Geometrie ebener Kurven* (1952), 88 Seiten mit 168 Figuren, broschiert Fr. 12.50. Band II: E. TROST, *Primzahlen* (1953), 95 Seiten, broschiert Fr. 13.50. Band IV, in Vorbereitung für Herbst 1955: W. BLASCHKE, *Geometrie der Waben*.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung – Available through your bookseller – Commandes à votre libraire

BIRKHÄUSER VERLAG · BASEL UND STUTTGART

EXPERIENTIA SUPPLEMENTUM I

Gegenwartsprobleme der Ernährungsforschung Present Problems in Nutrition Research Les problèmes actuels de la nutrition

SYMPOSIUM BASEL, 1.–4. X. 1952

Unter dem Patronat der Internationalen Union der Ernährungswissenschaften – Under the auspices of the International Union of Nutrition Sciences – Sous le patronage de l'Union internationale des sciences de la nutrition – Direction: F. Verzár – Organisation: Experientia

Beiträge: E. ABRAMSON, W. R. AYKROYD, K. BERNHARD, A. B. L. BEZNÁK, E. J. BIGWOOD, H. D. CREMER, D. P. CUTHBERTSON, H. DAM, V. DEMOLE, S. J. FOLLEY, L. J. HARRIS, O. HÖGL, K. LANG, K. THOMAS, J. TRÉMOLIÈRES, A. G. VAN VEEN, A. I. VIRTANEN, H. KRAUT, J. KÜHNAU, S. MARKEES, T. H. MOORE, A. SCHÜRCH, J. C. SOMOGYI, F. TERROINE etc.

Ganzleinenband - Full cloth - Relié en toile - (1953) - 312 Seiten. Fr. 32.— (DM 32.—)

BIRKHÄUSER VERLAG · BASEL/STUTTGART